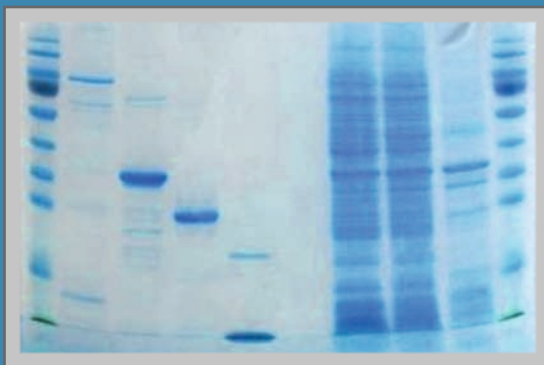


# Gentechnische Herstellung und Charakterisierung der Hämolsine von *Brachyspira hyodysenteriae*

---

Annegret Lucia Reiher



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Gentechnische Herstellung und Charakterisierung der  
Hämolysine von  
*Brachyspira hyodysenteriae***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Annegret Lucia Reiher geb. Deußner**

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen, 2012

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer  
Prof. Dr. Gerald Reiner

Tag der Disputation: 11. Dezember 2012

*Meiner Familie*

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster:

S. Barth, A. Reiher, G. Baljer, W. Herbst (2012). Failure to induce hemolysis by use of recombinant hemolysin (rHlyA) of *Brachyspira hyodysenteriae*. Tagung der Fachgruppe Mykologie und Bakteriologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 27. bis 29. Juni 2012 Leipzig

Diese Arbeit wurde finanziell gefördert durch ein Stipendium der Graduiertenförderung der Justus-Liebig-Universität Gießen und die Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>IV</b>
<b>1        EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2        SCHRIFTTUM .....</b>	<b>3</b>
2.1     Schweinedysenterie (allgemein).....	3
2.2     Wirkungsweise der Hämolsine von Bakterien .....	6
2.3     Hämolsine der Brachyspiren.....	9
2.3.1   Die Hämolsine TlyA, TlyB und TlyC .....	10
2.3.2   Das Hämolsin HlyA.....	11
2.3.3   Lokalisation der Hämolsine.....	12
2.4     Hämolsine der Leptospiren .....	13
2.4.1   Hämolsine mit Sphingomyelinaseaktivität .....	14
2.4.2   Hämolsine ohne Sphingomyelinaseaktivität.....	16
2.5     Hämolsine der Borrelien .....	17
2.6     Hämolsine bei Treponemen.....	19
2.7     Schlussfolgerungen.....	21
<b>3        MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
3.1     Materialien.....	22
3.1.1   Verbrauchsmaterialien und Puffer .....	22
3.1.2   Bakterienstämme .....	22
3.1.3   Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs) .....	22
3.1.4   Plasmide .....	23
3.1.5   Zelllinien.....	25
3.1.6   Tiere.....	25
3.2     Bakteriologische Methoden .....	25
3.2.1   Anzucht von Bakterien.....	25
3.2.2   Prüfung auf Vorliegen eines CAMP-Phänomens .....	27
3.2.3   Keimzahlbestimmung .....	28
3.2.4   Reinheitskontrolle.....	29
3.3     Molekularbiologische Methoden .....	29
3.3.1   Präparation von DNS aus Bakterienkulturen .....	29
3.3.2   DNS-Bestimmung.....	29

3.3.3	Restriktion von DNS .....	30
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.3.5	Primer .....	31
3.3.6	Agarosegelelektrophorese.....	34
3.3.7	DNS-Klonierung .....	34
3.3.8	DNS-Sequenzierung .....	35
3.4	Proteinanalytische Methoden .....	35
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
3.4.2	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	35
3.4.3	Löslichkeitsanalysen von <i>E. coli</i> -Proteinen .....	36
3.4.4	Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen an einer Ni <sup>2+</sup> -NTA-Matrix .....	36
3.4.5	Herstellung von HE-Extrakten .....	38
3.4.6	Proteinfällung aus dem Überstand.....	39
3.5	Serologische Methoden.....	39
3.5.1	Konjugate .....	39
3.5.2	Serumabsorption .....	39
3.5.3	Westernblot .....	40
3.5.4	Immunoblot .....	40
3.5.5	Verwendete Seren.....	41
3.6	Zellkulturmethoden .....	41
3.6.1	Kultivierung und Archivierung der Zellen .....	41
3.6.2	Toxizitätstests .....	43
3.7	Tierexperimentelle Methoden .....	44
3.7.1	Tierhaltung .....	44
3.7.2	Herstellung der Impfstoffe .....	45
3.7.3	Herstellung rHämolysin-spezifischer Antiseren im Kaninchen .....	45
3.8	Datenhaltung und Auswertung .....	46
3.8.1	Bilddokumentation und Auswertung .....	46
3.8.2	Auswertung von DNS-Sequenzdaten .....	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
4.1	Vorkommen verschiedener Hämolysingene bei <i>B. hyodysenteriae</i> -Serotyp- Referenzstämmen .....	47
4.2	Klonierung und Expression der <i>B. hyodysenteriae</i> -Hämolysingene in <i>E. coli</i> .....	47
4.2.1	Klonierung .....	47
4.2.2	Klonierungsstrategie für die HlyA-Transformanten .....	49
4.2.3	Proteinexpression und -reinigung .....	51



4.2.4	Optimierung der Proteinexpression .....	57
4.2.5	Proteingehalte der exprimierten und gereinigten rekombinanten Hämolsin- Präparationen.....	57
4.3	Ergebnisse der Immunisierungsversuche .....	58
4.3.1	Immunantwort von Kaninchen nach Immunisierung mit rHämolsinen von <i>B.</i> <i>hyodysenteriae</i> .....	58
4.3.2	Serologische Kreuzreaktionen zwischen den rHämolsinen .....	60
4.4	Nachweis verschiedener Hämolsine bei unterschiedlichen <i>B. hyodysenteriae</i> - Serotypen unter Verwendung der rHämolsin-Antiseren .....	61
4.5	Nachweis von Antikörpern gegen die verschiedenen rHämolsine von <i>B.</i> <i>hyodysenteriae</i> bei Schweinen .....	64
4.5.1	Seren rekonvaleszenter Schweine (Antiserumpool) und experimentell infizierter Ferkel .....	64
4.5.2	Antikörpernachweis gegen verschiedene rHämolsine in Seren von Schweinen vor und nach intragastraler experimenteller Infektion mit <i>B. hyodysenteriae</i> .....	65
4.6	Hämolytische Aktivität der Transformanten und der gereinigten rHämolsine im Vergleich zu einem Hämolsinextrakt aus <i>B. hyodysenteriae</i> .....	67
4.6.1	Prüfung der hämolytischen Aktivität des B204-HE-Extrakts (positive Kontrolle).....	67
4.6.2	Hämolsinbildung der Transformanten bei Vermehrung auf verschiedenen, festen Nährmedien.....	70
4.6.3	Untersuchung der Transformanten im CAMP-Test.....	72
4.6.4	Hämolyse-Induktion der rHämolsine im Hämolyse-Assay .....	74
4.6.5	Zytotoxizität der rHämolsine .....	75
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>106</b>
10.1	Abbildungen .....	106
10.2	Tabellen .....	107
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>109</b>

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

° C	° Celsius
A. dest.	Aqua destillata
<i>B.</i>	<i>Brachyspira</i>
BAP	Blut-Agarplatte
BHI	brain-heart-infusion (Nährbouillon)
BHWA1_00962	Gen zu Protein BHWA1_ 00962
BHWA1_01870	Gen zu Protein BHWA1_ 01870
bp	Basenpaare
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
d	Tage
DNS	Desoxyribonukleinsäure
d.p.i.	Tage post infectionem
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Fa	Firma
FKS	Fötales Kälberserum
GZL	Ganzzelllysate
h	Stunde
His-Tag	Histidin-Marker, bestehend aus 6 Histidinen
<i>hly</i>	Gen zu Protein Hly
<i>hlyA</i>	Gen zu Protein HlyA
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
Kb	Kilobasen
Kbw/min	Kippbewegungen pro Minute (gezählt wird jeder Anschlag)
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
LB	Luria Bertani (Nährbouillon)
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Stichprobenumfang
ng	Nanogramm
<i>nox</i>	Gen der NADH-Oxidase für Aerotoleranz
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Psychrobacter</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

---

PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<i>R.</i>	<i>Rhodococcus</i>
RNS	Ribonukleinsäure
<i>ypIQ</i>	Gen zu Protein YpIQ
r	rekombinant
rHämolysine	rekombinant hergestellte Hämolysine
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
s	Sekunde
<i>Scc.</i>	<i>Streptococcus</i>
s.k.	subkutan
SD	Schweinedysenterie
SDS	Sodium (=Natrium)-Dodecylsulfat
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sp	Spezies
<i>T.</i>	<i>Treponema</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>tlyA</i>	Gen zu Protein TlyA
<i>tlyB</i>	Gen zu Protein TlyB
<i>tlyC</i>	Gen zu Protein TlyC
TSA	Trypticase-Soja-Agar
U	Unit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
US	Ultraschall
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil



# 1 EINLEITUNG

*Brachyspira (B.) hyodysenteriae* verursacht die Schweinedysenterie (SD), eine mukohämorrhagische Durchfallerkrankung von weltweiter Verbreitung und hoher ökonomischer Bedeutung für die Schweineproduktion (Taylor und Alexander, 1971). Obwohl die Krankheit bereits schon vor knapp 100 Jahren beschrieben wurde, verbleiben eine Reihe bisher unbeantworteter Fragen, insbesondere zur Pathogenese der SD. Um die Pathogenese aufzuklären bedarf es zunächst der Kenntnisse sicherer Virulenzfaktoren.

Von den bisher bekannten Virulenz-/Fitnessfaktoren und -eigenschaften bei *B. hyodysenteriae*, wie z. B. die Chemotaxis des Erregers zu Muzin, die Toleranz gegenüber Sauerstoff (Aerotoleranz), die Fähigkeit Eisen zu akquirieren oder das Lipooligosaccharid (LOS) (ter Huurne und Gaastra, 1995), scheinen die Hämolyse für die Entstehung der mukohämorrhagischen Durchfallerkrankung besondere Bedeutung zu haben (Kinyon et al., 1977).

Hinweise hierfür lassen sich aus den Folgen der Applikation hämolysierender Extrakte von *B. hyodysenteriae* in Darmligaturen von Ferkeln ableiten (Lysons et al., 1991; Wannemuehler, 1994). Die entstandenen pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen waren denen einer natürlichen Infektion vergleichbar. Auch das Wachstum auf bluthaltigen Nährböden gibt Hinweise auf die Bedeutung der Hämolyse. Nur das Wachstum des Dysenterieerregers geht mit der Ausbildung einer starken, vollständigen Hämolyse einher. Die weiteren beim Schwein vorkommenden nicht oder gering pathogenen *Brachyspira* Spezies induzieren dagegen lediglich eine schwache Hämolyse.

Die Erforschung der hämolytischen Aktivität der Brachyspiren wurde durch die Tatsache, dass mehrere Hämolyse gebildet werden jedoch erheblich erschwert. Hinzu kommt, dass neben den vier schon länger bekannten Hämolyse nach der kürzlich publizierten Genomsequenz eines australischen *B. hyodysenteriae*-Stammes weitere vier Hämolyse vorhergesagt wurden, über die keinerlei phänotypische Informationen vorliegen (Bellgard et al., 2009).

Das gesamte Wissen zur Identifizierung der Hämolyse-kodierenden Gene der bereits bekannten Hämolyse fußt auf der Beurteilung einer nach der Klonierung erworbenen Hämolyse von transformierten *E. coli*-Zellen. Zur Klonierung wurde jedoch nicht nur das Hämolyse-kodierende Gen, sondern auch benachbarte Genabschnitte verwendet. Auf einen möglichen Einfluss dieser zusätzlich klonierten Sequenzen wurde nie näher eingegangen (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). Des Weiteren fehlen bis heute

Untersuchungen an den isoliert dargestellten rekombinanten Proteinen. Um diese Proteine unzweifelhaft als Hämolsine zu charakterisieren ist ein derartiger Schritt unumgänglich.

Es sind mehrere andere Toxine bekannt geworden, die im Rahmen ihrer rekombinanten Herstellung zwar zur Hämolyse des Transformanten führten, sich jedoch nach näherer Analyse des Genprodukts nicht als Hämolsine charakterisieren ließen (Damman et al., 2000; Carvalho et al., 2009; Carvalho et al., 2010). Ursache hierfür könnte sein, dass z. B. die klonierten Inserts *E. coli*-eigene Hämolsine hochregulieren. Diese Annahme ist im Schrifttum mehrfach belegt worden (Oscarsson et al., 1996). Für die geplanten Untersuchungen über biologische und antigene Eigenschaften der Hämolsine von *B. hyodysenteriae* erscheint es daher sehr wichtig, lediglich die für die Hämolsine kodierenden Sequenzen in *E. coli* zu klonieren und als Fusionsproteine zu exprimieren.

Im experimentellen Teil der Arbeit ist zunächst zu prüfen, ob alle Hämolsin-Gene in *E. coli* klonier- und als Fusionsprotein exprimierbar sind. Im positiven Fall soll dann geklärt werden, ob die Proteine Antigene darstellen und auch als Antigen von Seren experimentell infizierter Schweine erkannt werden. Hierbei wird auch von Interesse sein, ob diese Proteine serologisch einheitlich sind. Zum Studium der biologischen Bedeutung sollen geeignete Bio-„Assays“ dienen. Von den Ergebnissen erwarten wir eine Antwort auf die Frage nach der Bedeutung dieser Proteine in der Pathogenese der SD.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Schweinedysenterie (allgemein)

Die Schweinedysenterie (SD) ist weltweit verbreitet und wurde erstmals 1921 in den USA als blutige Durchfallerkrankung infolge einer nekrotisierenden, hämorrhagischen Entzündung der Magen- und Dickdarmschleimhaut beschrieben (Whiting et al., 1921). In Europa trat die Erkrankung 1935 in Italien zum ersten Mal auf (Duthie, 1966). 1971 wurden von Taylor und Alexander nach Erfüllung der Henle-Koch'schen-Postulate Spirochaeten für die Erkrankung verantwortlich gemacht (Taylor und Alexander, 1971). Auch in Deutschland ist die SD weit verbreitet (Herbst et al., 2004).

Die aktuelle Bezeichnung des Erregers der SD lautet *Brachyspira (B.) hyodysenteriae*. Dies ist die einzige Spezies der Familie Brachyspiraceae innerhalb der Ordnung Spirochaetales. Weitere zu dieser Ordnung zählende Familien sind die Leptospiraceae und Spirochaetaceae, von denen die Gattungen *Leptospira* und *Borrelia* veterinärmedizinische Bedeutung besitzen. Aller Wahrscheinlichkeit nach existieren zahlreiche weitere, den Spirochaeten zuzuordnende Bakterien, über die, abgesehen von ihrer schraubenförmigen Morphologie, jedoch kaum etwas bekannt ist (Paster und Dewhirst, 2000).

Die Bezeichnung des Erregers änderte sich in der Vergangenheit mehrfach. Ursprünglich wurde der Erreger als *Treponema hyodysenteriae* klassifiziert (Harris et al., 1972). 20 Jahre später zeigten 16S rRNA-Analysen, dass der Erreger nicht zu der Familie der Treponemen gehört. Er wurde daher als *Serpula* klassifiziert, wobei diese Einordnung nur ein Jahr bestand bevor der Erreger der Familie der *Serpulinae* zugeordnet werden konnte (Stanton, 1992). Weitere fünf Jahre später klassifizierte man den Erreger aufgrund neuer Erkenntnisse und Untersuchungen als *Brachyspira (B.) hyodysenteriae*. Diese taxonomische Einordnung ist bis heute gültig.

*B. hyodysenteriae* ist ein gram-negatives, anaerobes jedoch aerotolerantes schraubenförmiges Bakterium mit einer Länge von 6-8,5 µm und einem Durchmesser von 320-380 nm. Aufgrund seiner Chemotaxis zu Mucin und mithilfe von Endoflagellen ist es in der Lage sich zielgerichtet fort zu bewegen. Von anderen Spezies der Familie Brachyspiraceae grenzt sich *B. hyodysenteriae* durch seine starke Hämolyse ab, die sonst nur bei der Spezies *B. suanatina* vorkommt.

Der Erreger hat eine hohe serologische Diversität und wurde in 9 Serotypen, bzw. Serogruppen unterteilt (Baum und Joens, 1979; Mapother und Joens, 1985; Hampson et al., 1989; Achacha und Mittal, 1995). Nach aktuellen Untersuchungen muss jedoch mit einer weitaus

höheren Zahl an Serotypen gerechnet werden (Schneider 2011, unveröffentlichte Daten). Die Übertragung des Erregers erfolgt oro-fäkal. Nach der Infektion scheiden Schweine den Erreger noch nach 70 bzw. 71 Tagen (teilweise bis zu 83 Tagen) mit dem Kot aus (Fisher und Olander, 1981). Die hohe Tenazität des Erregers im Kot (lebensfähig bis zu 112 Tage bei 10 °C) begünstigt die Ausbreitung der Krankheit (Boye et al., 2001). Nach überstandener Infektion sind die betroffenen Tiere gegenüber einer Infektion mit dem homologen Erreger geschützt. Sehr wahrscheinlich ist der Schutz jedoch lediglich auf den jeweiligen Serotyp begrenzt (Joens et al., 1983).

Die Dysenterie ist eine Faktorenkrankheit. Nach Ingestion gelangt der Erreger via Magen und Dünndarm in den Dickdarm. Die Magenpassage überleben die Brachyspiren zum Einen geschützt durch den schleimigen Kot in dem sie aufgenommen werden, und zum Anderen gewährt die im natürlichen Fall extrem hohe Infektionsdosis das Überleben einer, für eine erfolgreiche Infektion ausreichenden, Zahl von Bakterien (Harris, 1999). Bei der Besiedlung des Dickdarms spielt die Fähigkeit des Erregers Sauerstoff zu metabolisieren eine wichtige Rolle. Die **Sauerstofftoleranz** erwerben die Brachyspiren über eine NADH-Oxidase. *B. hyodysenteriae*-Knockout-Stämme, denen das kodierende *nox*-Gen deletiert wurde, haben eine deutlich geringere Virulenz als der isogene Wildtyp-Stamm (Stanton et al., 1999).

Weitere Faktoren, die eine Kolonisierung des Epithels ermöglichen, sind die Beweglichkeit und die Chemotaxis des Erregers zu Muzin. Die **Beweglichkeit** erhält der Erreger über periplasmatische Flagellen. Deletionsmutanten, denen die Gene *flaA* und *flaB* fehlten, waren im Tierversuch an Mäusen, abhängig vom Hintergrund des eingesetzten Stammes, entweder gar nicht mehr oder nur noch in stark reduzierter Weise in der Lage das Epithel zu kolonisieren (Kennedy et al., 1997). Der Erreger besitzt eine **positive Chemotaxis** und eine besonders hohe Beweglichkeit in Muzin (Kennedy et al., 1988). Für die Kolonisierung des Epithels scheint dies der wichtigste Schritt zu sein (Kennedy und Yancey, 1996). Infolge der gleichzeitigen Besiedlung der Becherzellen kommt es zu einer starken Schleimproduktion, die ein charakteristisches Kennzeichen der SD darstellt.

Ein weiterer, wichtiger Schritt bei der Besiedlung des Kolons könnte, neben der Beweglichkeit, die **Adhäsionsfähigkeit** des Erregers sein. Dieser Punkt wird nach wie vor kontrovers diskutiert (ter Huurne und Gaastra, 1995). In verschiedenen *in-vitro*-Versuchen konnte eine Anheftung von *B. hyodysenteriae* sowohl an Schweineepithelzellen (Knoop et al., 1979), als auch an HeLa und Henle intestinal (Int-407) Zellen (Wilcock und Olander, 1979; ter Huurne und Gaastra, 1995) beobachtet werden. Auch aktuelle Untersuchungen belegen, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme spezifisch an animale Darmepithelzellen adhärieren können und dass an dieser Adhäsion mindestens die äußeren Membranproteine (OMP) Bhlp16, Bhlp29.7d, Bhmp39f und Bhmp39h von *B. hyodysenteriae* mitbeteiligt sind. Die vier genannten OMPs erwiesen sich in den Untersuchungen als serologisch einheitlich.



Gleichzeitig waren Antikörper gegen diese OMPs in der Lage, die Adhärenz der Bakterien an die Zellkulturen serotypübergreifend zu inhibieren. Vor allem die Proteine Bhlp16 und Bhmp39f waren hieran maßgeblich beteiligt (Richter, 2009). Die Frage der Adhäsion *in-vivo* ist jedoch nicht abschließend geklärt. *In-vivo* Versuche wurden bislang nur von einer Arbeitsgruppe durchgeführt. Von dieser konnte keine Adhärenz des Erregers nachgewiesen werden (Kennedy et al., 1988).

Brachyspiren wurden nach der Infektion vor allem in Becherzellen und degenerierten Epithelzellen, aber auch in der Lamina propria nachgewiesen. (Glock et al., 1974; Kennedy und Strafuss, 1976). Der Mechanismus der Invasion konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Pohlenz und Kollegen postulierten 1983 ein aktives Eindringen in die Becherzellen mit anschließender Vermehrung und Ausbreitung (Pohlenz et al., 1983). Andere Untersucher hingegen vermuteten einen anderen Invasionsmechanismus. Sie hielten es für möglich, dass es zu einem Verlust der „tight-junctions“ in der Basalmembran der Epithelzellen kommt, was auf eine enzymatische Aktivität der Brachyspiren, bzw. auf eine erhöhte Zytokin-Produktion befallener Epithelzellen hinweisen könnte (ter Huurne und Gaastra, 1995).

Neben den oben genannten Faktoren, welche der Kolonisierung des Erregers dienen, spielen auch Toxine wie Lipooligosaccharide (LOS) und Hämolsine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese. Das **LOS** von *B. hyodysenteriae* wurde bereits 1979 beschrieben (Baum und Joens, 1979). Untersuchungen aus dem Jahre 1983 zeigten einen Zusammenhang zwischen Zellläsionen im Darm von Mäusen und dem LOS von Brachyspiren (Nuessen et al., 1983). Beim Vergleich zwischen dem LOS von *B. hyodysenteriae* und jenem von *B. innocens* wurde jedoch deutlich, dass sich die unterschiedliche Pathogenität der beiden Spezies nicht allein durch das LOS erklären ließ, da sich diese hinsichtlich der biologischen Aktivität kaum voneinander unterschieden (Greer und Wannemuehler, 1989). In Verschiedenen *in-vitro*-Versuchen (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Wannemuehler, 1994), aber auch *in-vivo*-Versuchen (Lysons et al., 1991; Hutto und Wannemuehler, 1999) stellte sich heraus, dass hämolysierende Protein-Extrakte auch eine zytotoxische Wirkung hatten und die für SD typischen Zellläsionen verursachten (s.u.). Dies könnte darauf hindeuten, dass es sich bei **Hämolsinen** und Zytotoxinen um die gleichen Proteine handelt.

Hämolsine kommen nicht nur bei Brachyspiren sondern auch bei anderen Spirochaeten vor. Die folgenden Kapitel widmen sich der vergleichenden Biologie der bei Spirochaeten vorkommenden Hämolsine.

## 2.2 Wirkungsweise der Hämolsine von Bakterien

Hämolsine sind zytolytische Toxine, die in einer Vielzahl von Bakterienspezies gefunden und aufgrund ihres Wirkmechanismus in drei Kategorien eingeteilt wurden (Rowe und Welch, 1994).

1. Hämolsine mit enzymatischer Wirkung: Diese Hämolsine führen zu einer enzymatischen Zerstörung der Zellmembran. Man unterscheidet Phospholipasen wie z.B. das  $\alpha$ -Toxin von *Cl. perfringens* (Krug und Kent, 1984) oder das  $\beta$ -Toxin von *Staphylococcus (S.) aureus*, welches eine Sphingomyelinase darstellt (Projan et al., 1989), sowie weitere Phospholipasen von anderen grampositiven und -negativen Bakterien (Titball, 1993). Diese Gruppe zeigt eine hohe Substratspezifität und reagiert mit verschiedenen Zielzellen (Titball, 1993).

2. Porenbildner: Zu dieser Gruppe gehören z.B. das  $\alpha$ -Toxin von *S. aureus* (Fussle et al., 1981), das Streptolysin O (Pinkney et al., 1989), das *E. coli*-Hämolsin (Bhakdi et al., 1986), das *Tethya lycurium*-Hämolsin (Mangel et al., 1992) und ein Zytolysin von Leishmanien (Noronha et al., 1996). Dieser Toxintyp ist also nicht nur bei Pro- sondern auch bei Eukaryoten vertreten. Die Toxine binden an die Zielmembran und penetrieren diese. Es kommt zur Ruptur der Membran und Änderung der Membranpermeabilität, was letztlich zur Zytolyse führt (Rowe und Welch, 1994).

3. Hämolsine mit „Surfactant“ Wirkung: Hämolsine aus dieser Gruppe sind stark hydrophob und wirken wie Detergenzien. Es kommt zur Auflösung der Zellmembran. Beispiele für Hämolsine mit „Surfactant“ Wirkung sind das  $\delta$ -Toxin von *S. aureus* (Freer und Arbuthnott, 1982) oder das hitzestabile Hämolsin von *Pseudomonas aeruginosa* (Liu, 1974).

Hämolsine scheinen bei allen Spirochaeten eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor zu spielen. Derzeit gibt es verschiedene Arbeitsgruppen die sich mit diesen Proteinen beschäftigen. In **Tabelle 1** sind alle derzeit bekannten Hämolsine der, aus veterinärmedizinischer Sicht, wichtigsten Familien aus der Ordnung der Spirochaetales zusammengefasst.

Tabelle 1: Charakteristika der bei Spirochaeten nachgewiesenen bzw. vorhergesagten Hämolyse

Genus	kodierendes Gen	Acc. Nr. (Position im Genom)	Spezies/Serovar <sup>1)</sup>	Gen- größe (bp)	Anzahl Amino- säuren	Molekular- gewicht (kDa)	Erläuterung <sup>2)</sup>
Brachyspira	BHWA1_01870	NC_012225 (2.156.246-2.156.917[rk])	<i>B. hyodysenteriae</i>	672	223	25,4	1
	BHWA1_00962	NC_012225 (1.121.381-1.122.679 [rk])	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.296	432	48,0	1
	<i>hly</i>	NC_012225 (704.857-706.191)	<i>B. hyodysenteriae</i>	1.335	444	50,9	1
	<i>hlyA</i>	U94886 (1.011-1.247)	<i>B. hyodysenteriae</i>	237	78	8,8	2
	<i>tlyA</i>	X61684 (471-1193)	<i>B. hyodysenteriae</i>	723	240	26,8	2
	<i>tlyB</i>	X73140 (96-2.582)	<i>B. hyodysenteriae</i>	2.487	828	93,2	2
	<i>tlyC</i>	X73141 (788-1.594)	<i>B. hyodysenteriae</i>	807	268	30,6	2
	<i>ypIQ</i>	NC_012225 (503.722 -504.396 [rk])	<i>B. hyodysenteriae</i>	675	224	25,6	1
	<i>sph1</i>	NC_004342 (1.036.189-1.037.982 [rk])	<i>L. interrogans Ser. Lai</i>	1.794	598	66,4	4
	<i>sph2</i>	NC_004342 (1.038.897-1.040.768 [rk])	<i>L. interrogans Ser. Lai</i>	1.872	624	69,3	3,4
Leptospira	<i>sph3</i>	NC_004342 (3.980.226-3.981.902)	<i>L. interrogans Ser. Lai</i>	1.677	559	62,1	2
	<i>sph4</i>	NC_004342 (3.016.001-3.016.720 [rk])	<i>L. interrogans Ser. Lai</i>	720	240	26,6	4
	<i>sphH</i>	U89708 (2.808-4.472)	<i>L. interrogans Ser. Lai</i>	1.665	555	61,6	3,4
	<i>sphA</i>	X52176 (581-2.248)	<i>L. interrogans Ser. Hardjo</i>	1.671	556	63,3	2
	<i>tlyA</i>	NC_004342 (324.579-325.409)	<i>L. interrogans Ser. Lai</i>	831	277	30,7	2
		NC_005823 (323.498 - 324.277)	<i>L. interrogans Ser. Copenhageni</i>	780	260	28,9	5
	<i>tlyB</i>	NC_005823 (384.087 - 386.627[rk])	<i>L. interrogans Ser. Copenhageni</i>	2.541	847	94,0	4

Fortsetzung der Tabelle und Erläuterungen auf der nächsten Seite

Ge- nus	kodierendes Gen	Acc. Nr. (Position im Genom)	Spezies/Serovar <sup>1)</sup>	Gen- größe (bp)	Anzahl Amino- säuren	Molekular- gewicht (kDa)	Erläuterun- gen <sup>2)</sup>
<i>Br.</i>	<i>tlyC/hlyC</i>	NC_005823 (3.852.653-3.853.987 [rk])	<i>L. interrogans</i> Ser. <i>Copenhageni</i>	1.335	445	49,4	4
		NC_004342 (3.911.603-3.910.269 [rk])	<i>L. interrogans</i> Ser. <i>Lai</i>	1.335	445	49,4	2
	<i>hlyX</i>	NC_004342 (371.890-370.712 [rk])	<i>L. interrogans</i> Ser. <i>Lai</i>	1.179	393	43,6	3
	<i>hlpA</i>	NC_004342 (1.648.977-1.649.918)	<i>L. interrogans</i> Ser. <i>Lai</i>	942	314	34,9	2
	<i>hlyA</i>	NC_004342 (184.904-185.128)	<i>L. interrogans</i> Ser. <i>Lai</i>	225	75	8,3	2
	<i>hap1</i>	U89708 (875-1.693)	<i>L. interrogans</i> Ser. <i>Lai</i>	819	273	30,3	3
<i>relia</i>	<i>blyA</i>	U96714 (1.192-1.395)	<i>B. burgdorferi</i>	204	68	7,4	4
	<i>blyB</i>	U96714 (1.399-1.746)	<i>B. burgdorferi</i>	348	116	13,0	4
<i>Treponema</i>	Hly (Cystalsin)	U30249 (73-1.272)	<i>T. denticola</i>	1.200	400	46,0	3
	<i>prtB</i>	L25603 (1-825)	<i>T. denticola</i>	825	273	30,4	3
	<i>hlyA</i>	NC_000919 (34.205-35.428)	<i>T. pallidum</i>	1.224	408	45,4	1
	<i>hlyB</i>	NC_000919 (35.442-36.803)	<i>T. pallidum</i>	1.362	454	50,4	1
	<i>tlyC</i>	NC_000919 (711.852-712.649 [rk])	<i>T. pallidum</i>	798	266	29,5	1
	<i>hlyC</i>	NC_000919 (1.017.604-1.018.677 [rk])	<i>T. pallidum</i>	1.074	358	39,7	1
	<i>hlyIII</i>	NC_000919 (1.133.934-1.134.650 [rk])	<i>T. pallidum</i>	717	239	26,5	1

**Erläuterungen:**

- <sup>1)</sup> **Ser.** = Serovar    <sup>2)</sup> **Hinweise auf hämolytische Aktivität:** **1** = aufgrund von Sequenzanalysen vermutet, **2** = phänotypisch nachgewiesen anhand der Hämolyse von Transformanten auf bluthaltigen, festen Nährböden, **3** = am isolierten, rekombinanten Protein bestätigt, **4** = keine hämolytische Aktivität des rekombinanten Proteins nachweisbar, **5** = keine Expression des Proteins möglich.

## 2.3 Hämolsine der Brachyspiren

Die seit mehreren Jahren bekannten Hämolsine von *B. hyodysenteriae* tragen die Bezeichnungen TlyA, TlyB, TlyC und HlyA und weisen Molekulargewichte von 26,9, 93,3, 30,8 bzw. 8,9 kDa auf. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand sind diese Hämolsine Ursache der ausgeprägten hämolytischen Aktivität von *B. hyodysenteriae* (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). Im Rahmen der Genomsequenzierung des Stammes WA1 wurden kürzlich weitere Gensequenzen identifiziert, die für das Vorliegen weiterer vier Hämolsine bei *B. hyodysenteriae* sprechen (Bellgard et al., 2009). Zwei dieser mutmaßlichen Hämolsine (kodiert durch die Gene **yplQ** und **BHWA1\_01870**) besitzen in ihren konservierten Domänen eine Übereinstimmung mit dem Hämolsin III. Bei der Hämolsin III-Superfamilie handelt es sich um integrale Proteine der Membran, welche durch Porenbildung zur Lyse von Erythrozyten führen und bei *Bacillus cereus* beschrieben wurden (Baida und Kuzmin, 1995; Baida und Kuzmin, 1996). Daher wurde auch für BHWA1\_01870 vermutet, dass es sich um ein Kanalprotein handeln könnte (Bellgard et al., 2009). Die beiden anderen mutmaßlichen Hämolsine (kodiert durch die Gene **hly** und **BHWA1\_00962**) besitzen eine CBS-Domäne. Bei den so genannten CBS (cystathionine-beta-synthase) Proteinen handelt es sich um kleine, intrazelluläre Proteine, die sowohl in bakteriellen, als auch in eukaryotischen Zellen vorkommen (Bateman, 1997; Ignoul und Eggermont, 2005). Ihre genaue Funktion ist derzeit noch nicht bekannt. Da sie in der Lage sind Adenosin-Derivate, wie z.B. ATP oder AMP, zu binden, könnten sie ein Regulator der Aktivität von Enzymen oder ein Sensor für intrazelluläre Metabolite sein (Kemp, 2004; Scott et al., 2004). In Chlorid-Ionen-Kanälen sind sie u.a. für den Ionentransport verantwortlich (Carr et al., 2003; Hebeisen et al., 2004). In dem Gen **BHWA1\_00962** wird offenbar zusätzlich eine Transporter-assoziierte Domäne „Cor-HlyC“ kodiert. Auch das **tlyC** weist eine entsprechende Gensequenz auf (Bellgard et al., 2009). Wanchanthuek und Kollegen äußerten 2010 die Vermutung, dass das von BHWA1\_00962 kodierte Protein der entscheidende Faktor bei der starken Hämolyse sein könnte da dieses Protein das einzige ist, was nur in *B. hyodysenteriae* und nicht in anderen, schwach hämolysierenden *Brachyspira* Spezies vorkommt (Wanchanthuek et al., 2010).

Nach verschiedenen experimentellen Belastungsstudien an Mäusen und Schweinen besitzen hämolysierende Extrakte von *B. hyodysenteriae* zytotoxische Eigenschaften und können demnach auch als Zytotoxine bezeichnet werden. So erwies sich gelchromatographisch gereinigtes Hämolsin aus *B. hyodysenteriae*-Kulturen *in-vitro* für verschiedene Epithelzellen wie z.B. CaCo-2-Zellen (colorectal carcinoma cell lines) und *in-vivo* im ‚Ligated-Loop‘-Test mit Colon und Ileum von Schweinen als zytotoxisch (Lysons et al., 1991; Wannemuehler, 1994). Sowohl in den ‚Ligated-Loops‘ von Schweinen, als auch nach intracaecaler Ap-

plikation von Hämolysin-Extrakten bei Mäusen, waren die SD-typischen Läsionen (Verlust und Verkürzung der Mikrovilli, Gewebeverlust, Verlust interzellulärer Verzahnung, erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Internalisation sowie Veränderung der Zellform, Exfoliation und Nekrosen der Epithelzellen) nachweisbar (Lysons et al., 1991; Hutto und Wannemuehler, 1999). Somit dürften die Hämolsine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der SD spielen. Zu der Bedeutung der einzelnen Toxine liegen jedoch nur begrenzte Informationen vor.

### 2.3.1 Die Hämolsine TlyA, TlyB und TlyC

*E. coli*-Zellen, welche das für **TlyA** kodierende Gen besitzen, verursachen auf Blutagarplatten eine deutliche Hämolyse. Durch einen osmotischen Schock freigesetzte Proteine dieser Zellen zeigen ebenfalls eine ausgeprägte hämolytische Aktivität für Schaferythrozyten. Die Freisetzung von Hämoglobin wurde durch PEG 1000 (2 nm) und Dextran 1500 (2,3 nm) kompetitiv gehemmt. Daraus wurde geschlossen, dass das Hämolysin die Bildung von Poren mit einem Durchmesser von 2 - 2,3 nm in der Erythrozytenmembran induziert (Muir et al., 1992; Hyatt und Joens, 1997; Hsu et al., 2001). Muir et al. (1992) publizierten hierzu jedoch abweichende Ergebnisse. So zeigten sie mittels der Zugabe von Saccharose, Raffinose und Dextran 5000, dass eine Hämolyse von Schaferythrozyten mittels Porenbildung nur dann möglich sein kann, wenn die Poren kleiner als 0,9 nm oder größer als 2,3 nm sind (Muir et al., 1992). Auch ter Huurne et al. (1994) zeigten in ihren Versuchen, dass eine Hämolyse durch Porenbildung nur dann möglich sein kann, wenn die Poren kleiner als 0,9 nm oder größer als 3,5 nm sind, wobei diese Arbeitsgruppe nicht mit Schaf- sondern mit Pferdeerythrozyten arbeitete (ter Huurne et al., 1994). Die Diskrepanz der Ergebnisse ist umso erstaunlicher, da alle Arbeitsgruppen die Überstände des gleichen Klons verwendeten. Diese Diskrepanz wurde aber nach aktuellem Kenntnisstand bisher nicht aufgeklärt. Für eine nicht unwesentliche Bedeutung von *tlyA* im Rahmen der Pathogenese der SD spricht, dass *tlyA*-Deletionsmutanten von *B. hyodysenteriae* im Tier (Maus und Schwein) eine reduzierte Virulenz im Vergleich zu dem isogenen Wildtypstamm aufwiesen (ter Huurne et al., 1992; Hyatt et al., 1994). So blieben nach Infektion von Schweinen mit *tlyA*-Deletionsmutanten der Stämme C5 oder B204 alle Tiere gesund. Dagegen erkrankten in den Kontrollgruppen 60 % (C5-Wildtyp) bzw. 100 % (B204-Wildtyp) der infizierten Schweine. Interessanterweise war nach Besiedlung des Darms mit *tlyA*-Deletionsmutanten ein partieller Schutz vor einer Belastungsinfektion mit virulenten *B. hyodysenteriae*-Stämmen gegeben (Hyatt et al., 1994). Dies könnte u. U. bedeuten, dass das TlyA für die Ausprägung einer Immunität nicht unbedingt benötigt wird, obwohl es anscheinend einen bedeutenden Virulenzfaktor darstellt. Rasback et al. untersuchten im Jahr 2007 die Spezies *B. suanatina* welche stark hämolysierend wächst und im Schwein sowohl klinisch als auch histologisch die typischen SD-Symptome verursacht. In keinem der

untersuchten Stämme konnte das Gen für TlyA nachgewiesen werden (Rasback et al., 2007). TlyA kann somit als verursachendes Merkmal für den stark hämolysierenden Phänotyp nicht in Frage kommen.

Von **TlyB** und **TlyC** wurden die kodierenden Gene sequenziert (ter Huurne et al., 1994). Kolonien von *E. coli*-Zellen, deren Plasmid die Gensequenz für *tlyB* oder *tlyC* aufwies, verursachten eine Hämolyse. Es ist allerdings unklar, ob diese auf eine eigene hämolytische Aktivität von TlyB bzw. TlyC zurückzuführen ist, oder ob diese Gene als Regulatoren für *E. coli*-eigene Hämolysine fungieren (ter Huurne et al., 1994). TlyB weist in der Aminosäuresequenz Übereinstimmung mit ClpB auf (ter Huurne et al., 1994). ClpBs sind Chaperone, die in verschiedenen Bakterien, z. B. *E. coli*, vorkommen und eine proteolytische Aktivität besitzen bzw. für die Regulation der proteolytischen Aktivität verantwortlich sind. Das Gen *tlyC* besitzt, wie auch das *hly*, eine CBS-Domäne. Ter Huurne und Kollegen wiesen 1994 mittels DNS-Hybridisierung das Gen für *tlyA* nur bei den stark hämolysierenden Stämmen der Spezies *B. hyodysenteriae* nach, Stämme der Spezies *B. innocens* waren dagegen negativ. Im Gegensatz hierzu konnte mittels DNS-Hybridisierung nachgewiesen werden, dass es im Genom von *B. innocens* Gensequenzen gibt, die Übereinstimmungen mit *tlyB* und *tlyC* aufweisen (ter Huurne et al., 1994).

### 2.3.2 Das Hämolysin HlyA

Das Protein **HlyA** wurde ursprünglich aus Kulturüberständen isoliert und gereinigt. Nach Ansequenzierung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe von degenerierten Primern die Nukleotidsequenz des Gens (*hlyA*) vollständig bestimmt (Hsu et al., 2001). Dabei stellte sich heraus, dass dem Protein eine bisher nicht bekannte, nur sieben Aminosäuren lange, Signalsequenz vorgeschaltet ist, die im reifen Protein nicht mehr nachweisbar war. Die Unfähigkeit von *hlyA*-transformierten *E. coli*-Zellen das rekombinante Hämolysin zu sezernieren, könnte auf diese Signalsequenz zurückgeführt werden, die vermutlich von *E. coli*-Zellen nicht erkennbar ist. Sie könnte Teil eines *Brachyspira*-spezifischen Sekretionsmechanismus sein.

HlyA ist ein (vermutlich porenbildendes) Hämolysin und induziert, ähnlich wie TlyA, eine vollständige Hämolyse (Hsu et al., 2001). Letzteres wird aus dem mit einer starken Hämolyse einhergehenden Wachstum der mit dem *hlyA*-Gen transformierten *E. coli* K12-Zellen auf bluthaltigen, festen Nährböden geschlossen. Über die Biologie des isolierten rekombinanten Proteins selbst liegen jedoch keinerlei Untersuchungsergebnisse vor.

Verschiedene Untersuchungen belegten, dass die Gensequenz für HlyA nicht nur in *B. hyodysenteriae*, sondern auch in anderen, schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. vorkommt (Zuerner et al., 2004; Wanchanthuek et al., 2010; Barth et al., 2012).

Es muss kritisch angemerkt werden, dass bei allen Klonierungen von *tlyA-C* und *hylA* größere Genabschnitte auf *E. coli* übertragen wurden und anschließend das Wachstumsverhalten der Transformanten auf Blutagarplatten überprüft wurde. Die hämolysierenden Klone besaßen demzufolge, neben den „open-reading-frames“ der Zielgene, weitere Nukleotidsequenzen upstream und downstream des Zielgens. Somit lässt sich aus den zitierten Untersuchungen nicht eindeutig erkennen, ob die veränderte biologische Funktion der Transformanten tatsächlich ausschließlich auf die Einschleusung des Zielgens zurückzuführen ist. Durchaus denkbar ist, dass auch die mit eingeschleusten, das Zielgen flankierenden, Gensequenzen Einfluss auf die Biologie der Transformanten genommen haben.

### 2.3.3 Lokalisation der Hämolysine

In der Literatur gibt es derzeit keine Angaben über die Lokalisation der Hämolysine in der Bakterienzelle und ihren Sekretionsmechanismus (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). Nach auf Sequenzdaten basierenden Vorhersagen (Programm pSortb: <http://www.psort.org/>) werden alle Hämolysine im Zytoplasma gespeichert. Eine Ausnahme macht das TlyC. Dieses Protein könnte sich auch als integrales Protein in der Zytoplasmamembran befinden. Nach den Ergebnissen dieser Analysen scheinen den Hämolysinen aber die klassischen Signalsequenzen zu fehlen. Dies ist erstaunlich, da bei verschiedenen anderen Proteinen von *B. hyodysenteriae* solche Sequenzen verbreitet vorkommen (Thomas und Sellwood, 1993). Bellgard und Kollegen konnten in einer Genomanalyse des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 die Gene für die sekretorischen Proteine SecA, SecE, SecG, SecY, SecD und SecF nachweisen (Bellgard et al., 2009). Somit ist es wahrscheinlich, dass Brachyspiren-Proteine über den klassischen sekretorischen Weg (Martoglio und Dobberstein, 1998) ausgeschleust werden. Das Fehlen von Signalsequenzen führt somit zwangsläufig zu der Frage, ob es sich bei diesen Proteinen tatsächlich um Hämolysine handeln kann, da diese in der Regel von der Bakterienzelle ausgeschleust werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Hämolysine über neue, derzeit noch nicht bekannte Signalsequenzen verfügen und/oder über einen noch unbekannten Sekretionsmechanismus verfügen. Erste Hinweise dafür geben Hsu und Kollegen (2001), welche eine bislang unbekannte N-terminal gelegene Signalsequenz (MALIDEI) beschrieben, die im reifen Protein nicht mehr nachweisbar war.



## 2.4 Hämolsine der Leptospiren

Als Virulenzfaktoren der Leptospiren gelten Lipopolysaccharide (Isogai et al., 1986), Glycolipoproteine (Alves et al., 1992), Peptidoglycan (Dobrina et al., 1995), Hitzeschockproteine (Stamm et al., 1991), Flagelline (Goldstein und Charon, 1990) und Hämolsine (Kasarov, 1970; Trowbridge et al., 1981; Thompson und Manktelow, 1986). Bislang wurden 11 mögliche Hämolsine und ein Lipoprotein (**Tabelle 1**) mit hämolytischer Wirkung identifiziert (Hauk et al., 2005; Zhang et al., 2005). 1956 wurden Hämolsin-ähnliche Substanzen bei pathogenen und saprophytischen *Leptospira*-Stämmen entdeckt (Alexander et al., 1956; Kmety et al., 1966). Diese wurden vorläufig als Enzyme, welche Phospholipide der Erythrozytenmembran angreifen, identifiziert. Weitere Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse und führten zu einer Einteilung der Leptospiren in drei Gruppen (Kasarov und Addamiano, 1969):

**Gruppe A** umfasst Leptospiren welche Lecithin aber kein Sphingomyelin zerstören. Hierzu gehören alle saprophytischen Stämme. Diese Stämme bewirken keine Hämolyse von Schaferythrozyten im Gegensatz zu solchen von Mensch, Kaninchen und Ratte. Diese Beobachtung passt zu der Tatsache, dass Schaferythrozyten zu über 60 % aus Sphingomyelin bestehen, die Erythrozyten anderer Spezies jedoch nur zu 0-60 % (De Gier et al., 1961).

**Gruppe B** beinhaltet Leptospiren Spezies, welche Lecithin und Sphingomyelin spalten können. Diese *Leptospira* Spezies verursachen eine Lyse sowohl von Schaferythrozyten als auch von Erythrozyten anderer Spezies.

Leptospiren der **Gruppe C** spalten weder Lecithin noch Sphingomyelin und sind nicht hämolytisch.

Pathogene Leptospiren gehören in die Gruppen B und C (Kasarov, 1970).

Thompson führte 1986 *In-vivo* Versuche an Kälbern durch. Nach intramuskulärer Injektion von Toxin welches mittels French-Press aus einem Serovar Pomona-Stamm gewonnen wurde zeigten sich Schäden an Erythrozyten, welche gegen eine enzymatische Aktivität der Hämolsine sprachen, sondern vielmehr auf einen metabolischen Effekt des Toxins auf Erythrozyten hinwiesen (Thompson, 1986). So kam es zu morphologischen Effekten wie Formveränderung (kugel- und stechapfelförmig) und Vakuolenbildung. Dies könnte entweder als Hinweis für das Vorkommen unterschiedlicher Hämolsine mit unterschiedlichen Wirkungsweisen oder auf unterschiedliche Wirkung *in-vivo* versus *ex-vivo* gewertet werden. Weitere Untersuchungen belegten die Annahme dass die Toxine *in-vivo* metabolische und morphologische Effekte (s.o.) auf die Erythrozyten ausübten (Thompson, 1986; Thompson und Manktelow, 1986).

2005 wurden alle derzeit bekannten Hämolsine von Leptospiren in zwei Gruppen eingeteilt: Hämolsine mit Sphingomyelinaseaktivität und Hämolsine ohne diese Aktivität (Zhang et al., 2005). Sphingomyelinasen kommen nur bei pathogenen Stämmen vor. Hämolsine ohne Sphingomyelinaseaktivität dagegen kommen auch bei saprophytischen Stämmen vor (Segers et al., 1992; Picardeau et al., 2008). Studien zum möglichen Wirkungsmechanismus wurden bisher an insgesamt sieben rekombinant hergestellten Hämolsinen durchgeführt (Lee et al., 2000; Lee et al., 2002; Hauk et al., 2005; Zhang et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Carvalho et al., 2010).

#### 2.4.1 Hämolsine mit Sphingomyelinaseaktivität

In diese Gruppe gehören die Hämolsine **Sph1-4**, **SphA** und **SphH**, wobei SphH eine Sonderstellung einnimmt (s.u.) (Ren et al., 2003; Zhang et al., 2005). Die Sphingomyelinasen **Sph1-4** kommen nur in pathogenen Stämmen vor und sind genetisch auffallend einheitlich (Ren et al., 2003). In *E. coli* kloniert führten alle Proteine zu einer Lyse von Schaferythrozyten (Zhang et al., 2005).

Im Jahr 1989 wurde das Hämolsin eines Serovar **Hardjo**-Stammes kloniert, dessen ORF für ein 64 kDa großes Protein kodiert (del Real et al., 1989). Dieses entspricht in der Größe in etwa einem Protein, welches bereits 1985 von einem Stamm des Serovars **Pomona** kloniert wurde (Dain et al., 1985) und eine hohe Übereinstimmung mit dem  $\beta$ -Hämolsin von *S. aureus*, bei dem es sich um eine Sphingomyelinase C handelt, aufwies (Bernheimer und Bey, 1986; Projan et al., 1989). Das von del Real und Kollegen (1989) klonierte Hämolsin wies ebenfalls Übereinstimmungen sowohl mit dem  $\beta$ -Hämolsin von *S. aureus*, als auch mit drei Sphingomyelinasen von verschiedenen *B. cereus*-Stämmen auf (Johansen et al., 1988; Yamada et al., 1988; Gilmore et al., 1989; Projan et al., 1989). Das entsprechende Gen wurde mit **sphA** bezeichnet (Segers et al., 1990; Segers et al., 1992). Obwohl der ORF für ein 64 kDa großes Protein kodiert, wies das Protein nur eine Größe von 39,2 kDa bzw. 41,6 kDa (inklusive eines Signalpeptids) auf (del Real et al., 1989). Posttranslationale Prozesse scheinen für den Unterschied verantwortlich zu sein (Segers et al., 1990).

**SphH**, ein Gen welches große Übereinstimmung mit **sphA** aufweist (Lee et al., 2000), wurde bei *Leptospira interrogans* Serovar **Lai** nachgewiesen und nach Klonierung in *E. coli* als rekombinantes Protein auf seine biologische Wirkung hin untersucht. SphH wirkte toxisch auf Erythrozyten und verschiedene Zelllinien (Lee et al., 2002). Die toxische Wirkung ließ sich auf eine Porenbildung in der Erythrozytenmembran zurückführen (Lee et al., 2002). Interessanterweise zeigte SphH im Gegensatz zu SphA keine Sphingomyelinaseaktivität und war auch nicht in der Lage andere Phospholipide zu hydrolysieren. Dies könnte auf die starken Unterschiede zwischen SphA und SphH in der Sekundärstruktur der Proteine zurück zu führen sein (Lee et al., 2000). Das aus dem Stamm Lai kodierte Fragment enthält neben der

Sequenz für *sphH* einen weiteren ORF, welcher für ein 272 Aminosäuren umfassendes Protein kodiert (*hap-1* = hemolysis associated protein-1). In Versuchen konnte gezeigt werden, das SphH und Hap-1 im Bezug auf die Hämolyse eine additive Wirkung haben (Lee et al., 2000). Dieser Effekt konnte auch in Verbindung mit HlyX beobachtet werden (s.u.) (Hauk et al., 2005).

**Hap-1** wurde später als Lipoprotein **LipL32** identifiziert. Dieses Lipoprotein stellt die prominenteste Fraktion im Proteinprofil der Leptospiren dar und scheint in der Membran lokalisiert zu sein (Haake et al., 2000). Es wird sowohl in der Kultur, als auch während einer Infektion im Wirtsorganismus gebildet. In pathogenen Leptospiren liegt es hochkonserviert vor und wurde daher für die Pathogenese, Diagnostik und Immunprophylaxe als bedeutungsvoll erachtet (Haake et al., 2000). In Untersuchungen aus dem Jahre 2001 und 2005 zeigte sich, dass die Immunisierung von Gerbils mit einem Adenovirus-Vektor, in welchen die LipL32-Sequenz kloniert wurde, zu einem 60 %igen Schutz der Tiere vor einer Infektion führte. Es scheint sich bei diesem Protein also um einen vielversprechenden Kandidaten für eine DNS-Vakzine zu handeln (Branger et al., 2001; Branger et al., 2005).

Bei dem Genprodukt von **sph2** konnten hämolytische und zytotoxische Wirkungen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2008). Durch Sph2 kommt es zu einer Stimulation von IL-1 $\beta$  und IL-6 in Lymphozyten und Makrophagen, außerdem zu Zellschrumpfung und angeschwollenen Mitochondrien im Zytoplasma. Weitere Versuche mittels Durchflußzytometrie bestätigten die Annahme, dass Sph2 zur Apoptose der Zellen führt. Auch in Leberzellen kam es nach Einwirkung von Sph2 zu Zellzerstörung. Seren von mit rSph2 immunisierten Tieren führten zu einem 70 %igen Schutz der Zellen vor der zytotoxischen Wirkung (Zhang et al., 2008).

Auch die **Proteine Sph1, 2, 4 und SphH** wurden bereits rekombinant exprimiert und auf ihre Funktion untersucht. Obwohl die Proteine Sph2 und SphH bereits früher untersucht worden waren und dabei hämolytische Aktivität zeigten (Lee et al., 2000; Zhang et al., 2008), wiesen Carvalho und Kollegen (2010) in ihren Versuchen bei keinem der rekombinanten Proteine eine hämolytische Aktivität nach. Die Autoren vermuteten, dass dieses Phänomen darauf zurück zu führen ist, dass die Proteine in ihren Versuchen nach der Expression in Einschlusskörperchen abgelagert wurden. Obwohl die Sekundärstruktur der Proteine korrekt zu sein schien, könnte es durch den Prozess der Faltung nach Freisetzung der Proteine aus den Einschlusskörperchen zu einem Verlust der hämolytischen Aktivität gekommen sein (Carvalho et al., 2010). Der Arbeitsgruppe um Carvalho gelang es nicht, das Protein in löslicher Form herzustellen, womit die Einschlusskörperchenhypothese nicht bewiesen werden konnte. Obwohl das rekombinante Hämolsin keine biologische Wirkung aufwies hemmten Antikörper gegen dieses Protein die hämolytische Wirkung des nativen Toxins. Da aber auch Seren von nicht immunisierten Tieren zu einer Hemmung der hämolytischen Aktivität führten,

wurde diese Reaktion als unspezifisch bewertet. Diese, schon früher beobachtete (Kojima et al., 1984) unspezifische Inhibition kann auf eine Interaktion mit dem Toxin und freien Phospholipiden, vor allem Sphingomyelin und Phosphatidylcholin, im Serum zurückgeführt werden.

Eine Immunisierung mit rSph2 und rSphH konnte bei experimentell mit Leptospiren infizierten Hamstern, obwohl Antikörper gegen Sph2 in Seren erkrankter Patienten und Antikörper gegen Sph2 und SphH in Seren experimentell infizierter Hamster nachweisbar waren, eine Leptospirose nicht verhindern (Carvalho et al., 2010).

#### 2.4.2 Hämolsine ohne Sphingomyelinaseaktivität

Zu dieser Gruppe gehören die Hämolsine, welche von den Genen *tlyA*, *tlyB*, *hlyC* (*tlyC*), *hlyX*, *hlpA* und *hlyA* (Zhang et al., 2005; Carvalho et al., 2009) kodiert werden (**Tabelle 1**). Diese Proteine wurden alle, außer *hlyA*, in *E. coli* kloniert und führten zu einer Lyse von Schaferythrozyten (Zhang et al., 2005).

Das Hämolsin **HlyX** wurde in Verbindung mit LipL32 (synonym Hap-1) untersucht (s.o.). Dabei zeigte sich, dass beide Proteine zusammen zu einer stärkeren Lyse der Erythrozyten führten und diese Hämolyse durch Antikörper gegen HlyX bzw. LipL32 verhindert werden konnte. HlyX konnte in allen getesteten pathogenen Stämmen nachgewiesen werden, nicht jedoch im apathogenen Stamm *L. biflexa* (Hauk et al., 2005). Dies spricht für eine Rolle von HlyX im Rahmen der Pathogenese. Aufgrund des immunogenen Potentials sowohl von HlyX, als auch von LipL32, könnten die Proteine als mögliche Impfkandidaten angesehen werden.

Im Jahr 2009 wurden Versuche mit den Proteinen **TlyB** und **TlyC** durchgeführt (Carvalho et al., 2009). Die Umbenennung von HlyC in TlyC erfolgte anhand der Benennung der *tly*-Hämolsin-Gruppe der Brachyspiren. TlyC wurde ohne die ersten 144 Nukleotide, welche eine Transmembranregion darstellen, kloniert. Es bindet an Laminin, Fibronectin und Kollagen IV und scheint daher ein Oberflächenmolekül zu sein. Sowohl rTlyB als auch rTlyC erwiesen sich als nicht hämolytisch. Dieser offensichtliche Widerspruch zu den Untersuchungen von Zhang et al. (2005) kann verschiedene Ursachen haben: Zum Einen könnte die fehlende Transmembran-Region zum Verlust der hämolytischen Aktivität führen, zum Zweiten könnten bei der Expression des Hämolsins in *E. coli* auch andere Proteine ko-exprimiert worden sein, welche zur Hämolyse führen. Nicht zuletzt könnte TlyC auch *E. coli*-eigene Hämolsine, z.B. SheA (ClyA) hochregulieren (Carvalho et al., 2009). Diese Beobachtung wurde bereits früher beim *slyA*-Genprodukt von Salmonellen gemacht (Oscarsson et al., 1996). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass das Klonieren des Gens *slyA* in einen *sheA*-defizienten *E. coli*-Stamm nicht mehr zu einem hämolsierenden Phänotyp führt. Das *slyA*-Genprodukt ist also kein Hämolsin per se, sondern ein Regulatorprotein welches

an den Promotor von *sheA* bindet, dieses Hämolsin hochreguliert und somit nur indirekt eine Hämolyse verursacht.

## 2.5 Hämolsine der Borrelien

Da Hämolsine bei Brachyspiren und Leptospiren vorkommen, war es nahe liegend auch Borrelien daraufhin zu untersuchen (Williams und Austin, 1992). Auf Blutagarplatten kam es nach 1-2 wöchiger Inkubationszeit sowohl bei dem *Borrelia burgdorferi*-Stamm Sh-2-82, als auch bei dem Stamm B-31 von *Borrelia burgdorferi* zu einer Lyse von Erythrozyten, wobei die Hämolyse bei dem Stamm B-31 im Vergleich mit dem Stamm Sh-2-82 verzögert auftrat. Am stärksten ausgeprägt war die Hämolyse bei Platten mit Pferdeerythrozyten, weniger ausgeprägt bei Rinder-, Schaf- und Kaninchenerythrozyten. Die Hitzelabilität des Hämolsins legte den Schluss nahe, dass es sich beim Borrelien-Hämolsin ebenfalls um eine Phospholipase oder Sphingomyelinase handeln könnte (Williams und Austin, 1992).

Es gelang zwei mögliche Hämolsin-kodierende Gene auf einem Plasmid von *Borrelia burgdorferi* zu identifizieren (Guina und Oliver, 1997). Das Gen **blyA** kodiert für ein 7,4 kDa großes Protein, das **blyB** für ein 13 kDa großes Protein (**Tabelle 1**). Während das Protein BlyB wohl nur einen stabilisierenden Effekt auf BlyA hat, konnte gezeigt werden, dass BlyA strukturelle Ähnlichkeiten mit dem  $\delta$ -Hämolsin von *S. aureus* (Fitton et al., 1980) und Melittin, einem Bientoxin (Terwilliger und Eisenberg, 1982), hat und somit wohl das eigentliche Hämolsin darstellt. Das  $\delta$ -Hämolsin von *S. aureus* und Melittin gehören zur einer Gruppe von Membran-interaktiven Toxinen, die durch Porenbildung zur Lyse der Zellen führen (Freer und Birkbeck, 1982; Dempsey, 1990).

Bei Untersuchungen zum Vorkommen von Phagen bei Borrelien stellte sich heraus, dass es sich bei dem Plasmid, das u.a. für *blyA* und *blyB* kodiert, um Bestandteile des Phagen-genoms handelt (Eggers und Samuels, 1999). Weitere Untersuchungen ergaben, dass BlyA und BlyB keine Hämolsine sondern vielmehr Holine darstellen (Damman et al., 2000). Bei Holinen handelt es sich um phageninduzierte, kleine, membranintegrale Proteine, welche gemeinsam mit dem Endolysin an der Lyse der Wirtszelle beteiligt sind (Wang et al., 2000; Rydman und Bamford, 2003). Die Holine reichern sich in der Zellmembran an. Zu einem bestimmten Zeitpunkt, welcher im Holin „programmiert“ ist, kommt es dann zur Auflösung der Zytoplasmamembran durch das Holin. Das Endolysin, welches im Zytosol akkumuliert, kann so die Mureinschicht erreichen und diese zerstören. So kommt es zur Lyse der Bakterienzelle. Holine determinieren die Dauer eines lytischen Zyklus eines Phagen (Wang et al., 2000; Rydman und Bamford, 2003). Die These, dass BlyA und BlyB zu den Holinen gezählt werden müssen, konnten Damman und Mitarbeiter (2000) mit mehreren Fakten untermauern. Zum Einen waren *E. coli*, die kein *sheA* (*clyA*) besitzen, auch nach Transfor-

mation mit *blyA* und *blyB* nicht hämolytisch. Bei *sheA* handelt es sich um ein *E. coli* eigenes Gen, das für ein Hämolysin kodiert (Oscarsson et al., 1999). Die nicht vorhandene hämolytische Aktivität in *sheA*-Deletionsmutanten spricht dafür, dass *blyA* und *blyB* keine Hämolysine sind, sondern vielmehr die Bildung von SheA in *E. coli* induzieren. Zum Zweiten konnte gezeigt werden, dass BlyA und BlyB Holin-typische Strukturen besitzen (Young und Blasi, 1995). Und die Induktion des Phagen mit MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-Nitroso-Guanidin) zu einem deutlichen Anstieg der Menge von BlyA und BlyB. Des Weiteren sind BlyA und BlyB membranassoziiert, haben einen Hang zur Oligomerisation und besitzen Holin-Aktivität (Damman et al., 2000). Allerdings konnte die Vermutung von Damman et al. (2000), dass BlyA und BlyB das *E. coli* eigene SheA induziert in weiteren Versuchen nicht belegt werden (Ludwig et al., 2008). Die Untersuchungsergebnisse der Autoren legten vielmehr den Schluss nahe, dass das im Zytosol nach basaler Expression vorliegende SheA durch die, von dem Holin BlyA zerstörte, Membran gelangte und zur Hämolyse im Medium führte. Diese Ergebnisse zeigten erstmals einen Zusammenhang zwischen der Hämolyse und dem Holin BlyA (Ludwig et al., 2008). In der gleichen Arbeit konnte kein hämolytischer Effekt von BlyB beobachtet werden. Die Frage, ob BlyB eine Rolle bei der Synthese, Aktivität oder Stabilität von BlyA spielt, konnte nicht beantwortet werden.

## 2.6 Hämolsine bei Treponemen

Wichtige Virulenzfaktoren von Treponemen sind die durch *tpr*-Gene (eine *Treponema*-spezifische Genfamilie) kodierten Proteine, Hämolsine, Regulatorproteine, sowie verschiedene Polysaccharide und Oberflächenproteine (Weinstock et al., 1998). Die bei *T. pallidum* gefundenen *tpr*-Gene kodieren für Proteine welche große Ähnlichkeit mit entsprechenden Proteinen (Msp [„major surface“-Proteine]) bei *T. denticola* haben. Die Msp binden an Fibronectin und Laminin und sind an der Adhäsion der Bakterien an Zielzellen beteiligt. Ebenfalls konnte eine porenbildende Aktivität der Msp nachgewiesen werden (Haapasalo et al., 1992; Egli et al., 1993; Fenno et al., 1996; Fenno et al., 1997). Außer der Ähnlichkeit zu Msp konnten keine weiteren Ähnlichkeiten mit anderen bekannten Proteinen gefunden werden, was vermuten lässt, dass es sich bei der Tpr-Familie um spezifische Proteine der Treponemen handelt (Weinstock et al., 1998).

Bei *T. pallidum* konnten bislang fünf Gene nachgewiesen werden, die für mutmaßliche Hämolsine kodieren (**Tabelle 1**, Weinstock et al., 1998). **HlyIII** gleicht dem Hämolsin III von *B. cereus* (Weinstock et al., 1998), das porenbildende Aktivität besitzt (Baida und Kuzmin, 1995; Baida und Kuzmin, 1996). Die vier anderen Hämolsine weisen sowohl untereinander als auch mit dem TlyC von Brachyspiren Sequenzübereinstimmungen auf (Weinstock et al., 1998).

Bei Treponemen aus dem Bereich der Mundhöhle, namentlich *T. denticola*, konnten ebenfalls Hämolsine bzw. Proteine mit hämolytischer Wirkung nachgewiesen werden (Grenier, 1991; Mikx und Keulers, 1992). Bislang sind drei bzw. vier Proteine mit hämolytischer Wirkung beschrieben (Fenno und McBride, 1998; Chan und McLaughlin, 2000). Hierbei handelt es sich um **Cystalysin (Hly)**, ein < 1 kDa schweres extrazelluläres Protein (Chu und Holt, 1994; Chu et al., 1994), **PrtB**, ein Chymotrypsin-ähnliches Protein (Arakawa und Kuramitsu, 1994) und ein weiteres, nicht näher benanntes Protein mit einem Molekulargewicht von **62 kDa** (Karunakaran und Holt, 1994). Von allen potentiellen Hämolsinen ist das Cystalysin (Hly) das am besten untersuchte Protein. Es ist zellassoziiert und hat sowohl hämolytische, als auch hämoxidative Eigenschaften, wobei die Aktivität abhängig vom Eisengehalt des Nährmediums ist. Bei niedrigem Eisengehalt steigt die Aktivität des Enzyms. Somit scheint es zur Eisenversorgung des Bakteriums beizutragen (Chu et al., 1994). Von der Biochemie ist jedoch lediglich bekannt, dass es Hämoglobin zu Methämoglobin und Sulfhämoglobin oxidiert. In Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopischen Studien zeigte sich, dass das Cystalysin in der Plasmamembran der Erythrozyten lokalisiert ist und dort zur Bildung von irregulären Löchern in der Membran führte (Chu et al., 1994). Einzelheiten dieses zur Hämolyse führenden Mechanismus sind jedoch nicht bekannt (Chu et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten eine auffällige Übereinstimmung von Cystalysin mit dem Protein

PatB von *Bacillus subtilis*, dem MalY-Protein von *E. coli*, anderen Aminotransferasen, sowie einer C-S-Lyase von *Corynebacterium glutamicum* (Chu et al., 1995). Die Autoren postulierten die Vermutung, dass das Cystalsin am Abbau von Aminosäuren beteiligt ist und die Hämolyse nur ein Nebeneffekt sei. Beide Effekte tragen vermutlich jedoch zur Pathogenität des Erregers bei (Chu et al., 1995). In nachfolgenden Studien entsprach die enzymatische Aktivität des Cystalsins der Aktivität einer Cystein-Desulfhydrase. Dabei wurden die Substrate Cystein, aber auch Cystin und Cystathionin, zu Pyruvat,  $\text{NH}_3$  und zu dem für verschiedene Zellen toxischen  $\text{H}_2\text{S}$  abgebaut. Gleichzeitig wurde dem Bakterium hiermit Energie, Stickstoff und Schwefel zum Aufbau von Aminosäuren zur Verfügung gestellt. Dies passte zu der Tatsache, dass  $\text{H}_2\text{S}$  in hohen Konzentrationen in Zahnfleischtaschen nachgewiesen werden kann (Rizzo, 1967; Beauchamp et al., 1984; Persson, 1992). Somit könnte das Cystalsin metabolische Aufgaben für das Bakterium übernehmen, aber auch ein wichtiger Virulenzfaktor sein (Chu et al., 1997; Chu et al., 1999).

Bei *T. denticola* wurden bislang verschiedene Proteasen entdeckt und untersucht (Que und Kuramitsu, 1990; MacDougall et al., 1991; Arakawa und Kuramitsu, 1994). Diese Proteine könnten der Bereitstellung von Aminosäuren für das Wachstum der Bakterien dienen oder die Wirtsabwehr schwächen, und somit eine zentrale Rolle bei der Besiedlung des Habitats einnehmen (Loesche, 1988; Makinen et al., 1995). Die Protease **PrtB** ließ sich mit verschiedenen Proteaseinhibitoren, wie z.B. Phenylmethylsulfonylfluorid, hemmen. Auch Zink hemmte die Aktivität des Enzyms, wohingegen Kalzium die Aktivität erhöhte. Das Enzym zerstörte sowohl humanes als auch tierisches Serumalbumin sowie Casein. Neben diesen proteolytischen Fähigkeiten führte es auch zu einer Zerstörung von Schaferythrozyten. Ob dies *in-vivo* eine Rolle spielt und das hämolytische Wachstum von *T. denticola* bestimmt, konnte bisher nicht geklärt werden (Arakawa und Kuramitsu, 1994). Das 1994 beschriebene, **62,5 kDa** große, Protein hat weder proteolytische Aktivität, noch handelt es sich um eine Phospholipase C. Magnesium, Kalzium und Zink hemmten die hämolytische Aktivität des Proteins, wohingegen EDTA keinen Effekt ausübte. Dies deckte sich mit Untersuchungen von Hämolysinen der Spezies *Vibrio vulnificus* und *Burkholderia pseudomallei* (Redfearn, 1964; Shinoda et al., 1985). Für die Untersuchung dieses 62,5 kDa Proteins von *T. denticola* wurden sowohl Kulturüberstände als auch durch einen osmotischen Schock freigesetzte Proteine eingesetzt. In den Kulturüberständen konnte keine hämolytische Aktivität detektiert werden, was darauf hindeutet, dass das Protein nicht freigesetzt wird. Die durch osmotische Schockbehandlung gewonnenen Proteinsuspensionen waren hingegen hämolysierend. Dies lässt darauf schließen, dass das Protein im periplasmatischen Raum akkumuliert (Karunakaran und Holt, 1994).



## 2.7 Schlussfolgerungen

Nach der recherchierten Literatur scheinen Hämolsine (Zytotoxine) für die Spirochaeten bedeutsame, wenn nicht überlebenswichtige Faktoren darzustellen. Zur Abklärung der biologischen Wirkung dieser Proteine wurde häufig das hämolysierende Wachstum von Transformanten auf Blutagarplatten herangezogen. Dies ist nach dem aktuellen Stand der Literatur jedoch nicht ausreichend und kann gleichzeitig zu Fehlinterpretationen führen, da die klonierten Gene z.T. Hämolsine der Wirtszellen aktivieren oder induzieren. Eine exaktere Erforschung der Wirkmechanismen dieser Proteine durch Verwendung hochreiner rekombinanter Proteine war ebenfalls mit großen Schwierigkeiten verbunden. Den entsprechend hergestellten Proteinen fehlte häufig die erhoffte biologische Wirkung. Somit ist in Zukunft, in möglicherweise nicht wenigen Fällen, mit einer Neueinschätzung der biologischen Bedeutung der Hämolsine der Spirochaeten zu rechnen, wie z.B. bei den Proteinen BlyA/BlyB von Borrelien oder TlyB/TlyC und Sph2/SphH von Leptospiren. Auch könnten neben der Hämolyse weitere biologische Eigenschaften entdeckt werden. Manche Proteine entfalten eine hämolytische Wirkung (PrtB von Treponemen), bzw. verstärken die Hämolyse (LipL32 von Leptospiren), obwohl ihre eigentliche biologische Aufgabe eine andere zu sein scheint. Künftige Versuche zur Aufklärung der biologischen Wirkung von Spirochaetenhämolsinen werden nach den Erfahrungen aus der zitierten Literatur außerordentlich schwierig sein und wahrscheinlich oft mit Misserfolgen einhergehen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Puffer sind im Anhang (ab **Seite 100**) aufgelistet.

#### 3.1.2 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden Referenz- und Feldisolate verwendet, die in der **Tabelle 2** mit ihren relevanten Eigenschaften aufgelistet sind. Hierzu zählten neun *B. hyodysenteriae*-Referenzstämme, welche die bekannten Serotypen und Serogruppen von *B. hyodysenteriae* repräsentierten. Diese werden im Folgenden als Serotyp-Referenzstämme bezeichnet. Im Rahmen der Klonierung der Hämolysingene diente der *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 als Spenderorganismus, als Empfängerorganismus der *E. coli*-Stamm BLR(DE3). Des Weiteren wurden sechs Feldisolate aus der institutseigenen Diagnostik für die Untersuchungen zum CAMP-Phänomen verwendet.

**Aufbewahrung der Brachyspiren-Stämme.** Die langfristige Aufbewahrung der Brachyspiren-Isolate erfolgt suspendiert in FKS (Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in flüssigem Stickstoff sowie in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium bei -70 °C.

#### 3.1.3 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen (GVOs)

Bei den gentechnisch veränderten Mikroorganismen handelt es sich um Abkömmlinge des *E. coli*-B-Derivats BLR(DE3) (**Tabelle 3**), in deren Genom mit Hilfe von rekombinanten Plasmiden DNS-Fragmente des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 eingefügt wurden (**Tabelle 4**). Die Lagerung der GMOs erfolgte bei -70 °C in LB-Medium mit einem Anteil von 30 % Glycerin.

**Aufbewahrung der transformierten *E. coli* BLR(DE3) Zellen.** Nach Standardanzucht der transformierten *E. coli*-Keime in LBM<sup>KT</sup> wurden die Klone bis zur Sequenzierung bei 4 °C gelagert. Klone, die nach den Ergebnissen der Sequenzierung das Insert korrekt und mit richtiger Sequenz integriert hatten, wurden auf LBA<sup>KT</sup> angezüchtet und anschließend mit 3 ml LB-Medium mit einem Anteil von 30 % Glycerin abgeschwemmt. Von jedem Klon wurden zwei Röhrchen bei -70 °C eingefroren.

### 3.1.4 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten, bzw. verwendeten, Plasmide sind in **Tabelle 4** aufgeführt. Für alle Klonierungsexperimente wurde das Plasmid pET-24b(+) als Vektor eingesetzt. Zur Veranschaulichung ist exemplarisch die Genkarte von pHIT-7-05 in **Abbildung 1** schematisch dargestellt.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Referenz- und Feldstämme**

Spezies	Stamm	relevante Eigenschaften	Her- kunft
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	B78	Serotyp 1, Serogruppe A	ISU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	B204	Serotyp 2, Serogruppe B	IM
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	B169	Serotyp 3, Serogruppe C	ISU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	A1	Serotyp 4, Serogruppe D	ISU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	B8044	Serotyp 5/2, Serogruppe B	ISU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	B6933	Serotyp 6/1, Serogruppe A	ISU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	ACK300/8	Serotyp 7/2, Serogruppe B	ISU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	Vic2	Serotyp nicht bekannt, Serogruppe H	MU
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	NSW1	Serotyp nicht bekannt, Serogruppe J	MU
<i>Escherichia coli</i>	BLR(DE3)	BL21-Derivat, F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) $\Delta$ ( <i>srl-recA</i> )306:: Tn10 (Tet <sup>R</sup> )	N
<i>Escherichia coli</i>	3306/05	Feldisolat	IHIT
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	PP	Feldisolat	IHIT
<i>Rhodococcus equi</i>	RE	Feldisolat	IHIT
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	Feldisolat	IHIT
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ScA	Feldisolat	IHIT
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ScD	Feldisolat	IHIT
<i>Streptococcus equi</i>	ScE	Feldisolat	IHIT

**Erläuterungen:** **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere; **IM** = ursprünglich Dr. D.L. Harris, Veterinary Medical Research Institute Iowa State University, Ames, USA, freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. G. Amtsberg, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; **ISU** = Prof. M.J. Wannemuehler, Veterinary Medical Research Institute Iowa State University, Ames, USA; **MU** = Prof. D.J. Hampson, School of Veterinary Studies, Murdoch University, Murdoch Western Australia; **N** = Fa. Novagen durch Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

**Tabelle 3: Übersicht über die gentechnisch veränderten *E. coli*-Stämme**

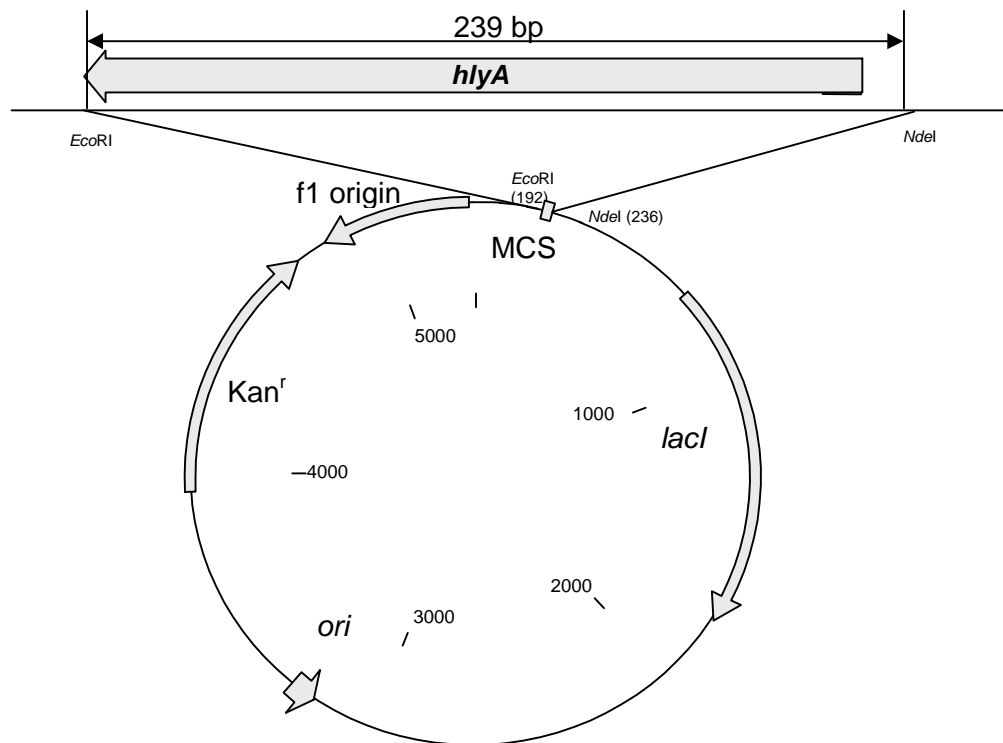
Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft
<b>BLR(DE3, pET-24b(+))</b>	BLR(DE3) mit Plasmid pET-24b(+)	IHIT
<b>ADhlyA</b>	BLR(DE3, pHIT-7-05), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>hlyA</i>	d. A.
<b>ADyplQ</b>	BLR(DE3, pHIT-7-06), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>yplQ</i>	d. A.
<b>ADtlyA</b>	BLR(DE3, pHIT-7-07), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>tlyA</i>	d. A.
<b>AD1870</b>	BLR(DE3, pHIT-7-08), B-Stamm mit pET-24b(+):BHWA1_01870	d. A.
<b>AD962</b>	BLR(DE3, pHIT-7-10), B-Stamm mit pET-24b(+):BHWA1_00962	d. A.
<b>ADhly</b>	BLR(DE3, pHIT-7-12), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>hly</i>	d. A.
<b>ADtlyB</b>	BLR(DE3, pHIT-7-13), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>tlyB</i>	d. A.
<b>ADtlyC</b>	BLR(DE3, pHIT-7-15), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>tlyC</i>	d. A.
<b>ADfabG</b>	BLR(DE3, pHIT-7-16), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>fabG</i>	d. A.
<b>ADhlyA<sup>-</sup></b>	BLR(DE3, pHIT-7-17), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>hlyA<sup>-</sup></i>	d. A.
<b>ADfabUm</b>	BLR(DE3, pHIT-7-18), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>fabG-hlyA-fabF</i>	d. A.
<b>ADfabF</b>	BLR(DE3, pHIT-7-19), B-Stamm mit pET-24b(+): <i>fabF</i>	d. A.

**Erläuterungen:** d. A. = diese Arbeit, IHIT = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere.

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Plasmide**

Plasmid	relevante Eigenschaften	Herkunft
<b>pET-24b(+)</b>	5.309 bp, pBR322 origin, f1 origin, <i>lacI</i> , Kan <sup>r</sup> , T7 Promotor, T7 Transkriptionsstart, T7 Terminator, His-Tag Kodierungssequenz	N
<b>pHIT-7-05</b>	pET-24b(+): <i>hlyA</i> , 5.498 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-06</b>	pET-24b(+): <i>yplQ</i> , 5.939 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-07</b>	pET-24b(+): <i>tlyA</i> , 5.987 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-08</b>	pET-24b(+):BHWA1_01870, 5.936 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-10</b>	pET-24b(+):BHWA1_00962, 6.560 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-12</b>	pET-24b(+): <i>hly</i> , 6.596 bp <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-13</b>	pET-24b(+): <i>tlyB</i> , 7.751 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-15</b>	pET-24b(+): <i>tlyC</i> , 6.071 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-16</b>	pET-24b(+): <i>fabG</i> , 6.011 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-17</b>	pET-24b(+): <i>hlyA<sup>-</sup></i> , 5.492 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-18</b>	pET-24b(+): <i>fabG-hlyA-fabF</i> , 7.664 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.
<b>pHIT-7-19</b>	pET-24b(+): <i>fabF</i> , 6.518 bp, <i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i> , Kan <sup>r</sup>	d. A.

**Erläuterungen:** N = Fa. Novagen durch Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, d. A. = diese Arbeit.



**Abbildung 1: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-7-05**

**Erläuterungen:** Kan<sup>r</sup> = Kanamycinresistenz-Gen, f1 origin = Replikationsursprung, MCS = "multiple-cloning-site".

### 3.1.5 Zelllinien

Für die Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Proteine wurden IPEC-J2-Zellen (Jejunum, Ferkel, Herkunft Dr. P. Schierack, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin), CRFK-Zellen (Niere, Katze, ATCC Nr. CCL-94) und MDCK-Zellen (Niere, Hund, ATCC Nr. CCL-34) verwendet.

### 3.1.6 Tiere

Zur Herstellung der benötigten Immunseren wurden sechs weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer eingesetzt (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln). Weitere Angaben zur Haltung und Fütterung sind **Kapitel 3.7** zu entnehmen.

## 3.2 Bakteriologische Methoden

### 3.2.1 Anzucht von Bakterien

**Standardanzucht von Brachyspiren.** Jeweils ein Kryotube einer tiefgefrorenen Brachyspiren-Charge wurde mittels Handwärme aufgetaut und unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1:49 [v/v] in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium überführt. Die Inkubation fand für drei bis fünf

Tage unter anaeroben Bedingungen (Anaerobierbox AnaeroPack Rectangular, Fa. Biome-rioux, Wien, Österreich; AnaeroGen, Fa. Oxoid, Hampshire, England) bei 37 °C auf einem Schüttler (96 U/min) statt. Zur Kontrolle der anaeroben Bedingungen wurde ein Sauerstoffindikator (Anaerotest, Fa. Merck, Darmstadt) mitgeführt.

**Anzucht der Brachyspiren auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Platten.** Vor der Chargenherstellung wurden die Brachyspiren auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Platten angezüchtet. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen (Anaerobiertopf Anaerocult, Fa. Merck, Darmstadt, AnaeroGen, Fa. Oxoid, Hampshire, England) bei 37 °C über fünf bis zehn Tage. Bei sichtbarer Kontamination wurden die Isolate unter lichtmikroskopischer Kontrolle passagiert, bis mikroskopisch keine Kontamina-tion mehr erkennbar war.

**Chargenherstellung der Brachyspiren.** Zur Herstellung einer Bakteriencharge wurde der Stamm B204 zunächst auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar vermehrt. Nach dem Reinheitsnachweis im Dun-kelfeldmikroskop erfolgte die Abschwemmung der Brachyspiren von der Platte mit ca. 3 ml BHIF<sup>CVSSR</sup> unter Reinraumbedingungen. Nach der Herstellung einer log10-Verdünnungsreihe über acht Stufen wurde 1 ml der Verdünnungsstufe 10<sup>-4</sup> in 49 ml BHIF<sup>CVSSR</sup> überführt und unter ständiger Bewegung (Schüttler, 96 U/min) inkubiert (anaerob, 37 °C, 3-4 d). Zur dauer-haften Lagerung bei -70 °C erfolgte die Abfüllung von 1 ml-Aliquots. Die Keimzahl-bestimmung wurde gemäß **Kapitel 3.2.3** durchgeführt. Vor der Verwendung der Charge wurde eine Reinheitskontrolle durchgeführt (**Kapitel 3.2.4**).

**Standardanzucht von *E. coli*.** Der *E. coli*-Stamm BLR(DE3) wurde unter aeroben Beding-ungen bei 37 °C auf LB-Agar (LBA<sup>T</sup>), bzw. in LB-Bouillon (LBM<sup>T</sup>), mit Tetracyclin (in letzterem Fall als Schüttelkultur mit 180 U/min) angezüchtet. Die Inkubationszeit lag bei 8 bis 18 Stunden. Die Selektion und Anzucht der transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte auf LBA<sup>KT</sup> bzw. in LBM<sup>KT</sup>.

**Anzucht von Transformanten auf verschiedenen Nährböden.** Alle Transformanten wur-den zur Prüfung auf hämolytische Eigenschaften auf Blut-Agarplatten mit Erythrozyten ver-schiedener Spezies (Pferd, Rind und Schaf) sowie auf Müller-Hinton-Agar mit Schafblut und DST-Agar mit Rinderblut angezüchtet. Zur Stabilisierung, bzw. zur Induktion der Proteinexpression wurden in verschiedenen Ansätzen Kanamycin und/oder IPTG zugegeben (siehe **Anhang ab Seite 100**). Die Inkubation erfolgte aerob (teilweise auch anaerob) bei 37 °C über zwei bis fünf Tage, wobei das Wachstum alle 12 h kontrolliert wurde.

**Induktion transformierter *E. coli*-Zellen.** Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden über Nacht als Vorkultur im Standardverfahren kultiviert. Nach Verdünnung der Vorkultur mit frischem LBM<sup>KT</sup> (1:100 [v/v]) folgte die Inkubation der Hauptkultur bei 37 °C bis zu der in **Tabelle 5** an-gegebenen OD<sub>600 nm</sub> (Photometer DU-640, Beckman Instruments, München). Nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) folgte eine erneute Inkubation der

Kultur bei 37 °C (**Tabelle 5**). Schließlich wurden die Bakterienzellen nach Bestimmung der OD<sub>600 nm</sub> abzentrifugiert (4.500 x g, 4 °C, 10 min) und das Pellet für die Gewinnung der Proteine weiterverarbeitet (**Kapitel 3.4.4**).

**Tabelle 5: Parameter für die Induktion transformierter *E. coli*-Zellen**

Bezeichnung des Klons	gewünschte OD <sub>600 nm</sub>	eingesetzte IPTG-Konzentration	Inkubationszeit nach Induktion
BLR (DE3, pET-24b(+))	0,5-0,6	15,6 µM	20 h
ADhlyA	0,5-0,6	15,6 µM	4 h
ADypIQ	0,5-0,6	7,8 - 1.000 µM	4 - 20 h
ADtlyA	0,5-0,6	250 µM	20 h
AD1870	0,5-2,0	7,8 - 1.000 µM	1 - 20 h
AD962	0,5-0,6	62,5 µM	4 h
ADhly	0,5-2,0	7,8 - 1.000 µM	30 min - 20 h
ADtlyB	0,5-0,6	250 µM	20 h
ADtlyC	0,5-0,6	15,6 µM	20 h
ADfabG	0,5-0,6	125 µM	4 h
ADfabF	0,5-0,6	125 µM	4 h
ADfabUm	0,5-0,6	125 µM	4 h
ADhlyA <sup>-</sup>	0,5-0,6	125 µM	4 h

**Erläuterungen:** IPTG = Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid.

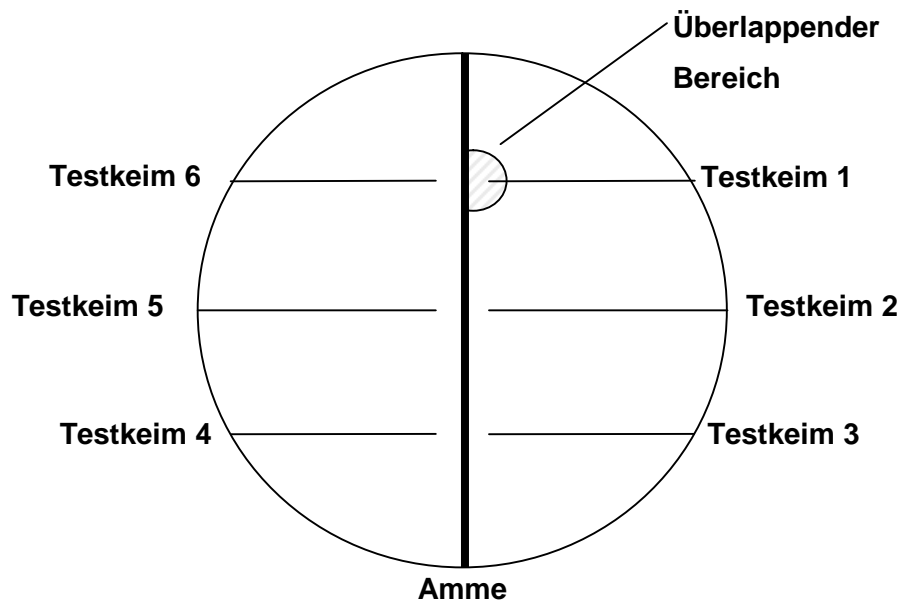
### 3.2.2 Prüfung auf Vorliegen eines CAMP-Phänomens

Bei den Untersuchungen zum CAMP-Phänomen wurden die in **Tabelle 2** aufgeführten Bakterienstämme als Ammen verwendet. Beim Standardverfahren wurden im rechten Winkel zur Amme die zu testenden Transformanten ausgestrichen. In der sich überlappenden Zone der beiden Keime wurde die entstandene Hämolyse beurteilt (**Abbildung 2**). Beim Kombinationsverfahren wurden neben der Amme auch der Stamm AD962 ausgestrichen. Zwischen den Impfstichen wurden die zu testenden Transformanten ausgestrichen. Auch hier wurde die Hämolyse in der sich überlappenden Zone der drei Stämme beurteilt (**Abbildung 3**).

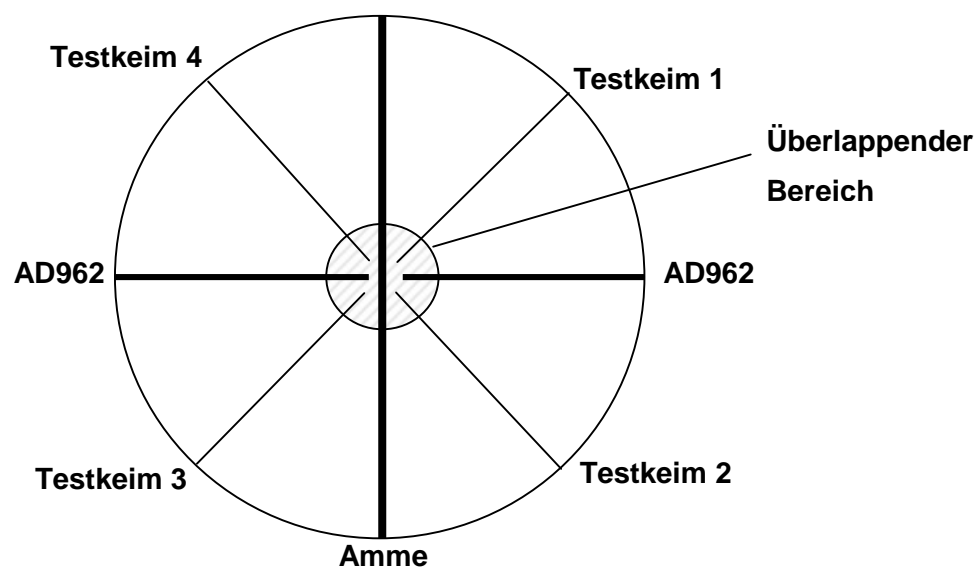
Im Standardverfahren kamen dabei folgende Bakterienspezies als Amme zum Einsatz: *S. aureus*, *Sc. equi*, *R. equi* und *P. phenylpyruvicus*. Alle Ansätze wurden auf Agarplatten mit Blutzusatz (Schaf-, Rinder- und Pferdeblut) sowie Müller-Hinton-Agar mit Schafblut getestet. Als Kontrollen kamen neben den oben angegebenen Stämmen die Spezies *Sc. agalactiae* und *Sc. dysgalactiae* zum Einsatz.

Im Kombinationsverfahren mit dem Klon AD962 kamen auf Blut-Agarplatten mit Schafblut *S. aureus*, *Sc. equi* und *R. equi* als Ammen zum Einsatz. Auf DST-Platten mit Rinderblut

kam *S. aureus* als Amme zum Einsatz. Getestet wurden die Transformanten ADhlyA, ADtlyA, ADtlyB und ADtlyC sowie die *hlyA*-Klone ADfabG, ADfabF, ADfabUm und ADhlyA<sup>-</sup>.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Standardverfahrens des CAMP-Tests.  
Testkeime: zu testende Transformanten



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Kombinationsverfahrens des CAMP-Tests.  
Testkeime: zu testende Transformanten

### 3.2.3 Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde nach jeder Anzucht eine Titration durchgeführt und die Keimzahl nach (Spearman, 1908) und (Kärber, 1931) geschätzt. Dafür wurde eine log 10-Verdünnungsreihe über acht Stufen hergestellt. Je Verdünnungsstufe wurden vier



10 µl-Tropfen auf einen TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar aufgebracht. Nach sieben Tagen Inkubation (anaerob, 37 °C) erfolgte die Auswertung makroskopisch anhand der Hämolyseplaques. Die je Verdünnungsstufe entstandenen Hämolyseplaques wurden protokolliert und hieraus der Titer der Wachstum-bildenden Einheiten 50 je ml (WbE<sub>50</sub>/ml) berechnet (**Formel 1**).

**Formel 1:** 
$$\text{WbE}_{50} = 10^{[X_0 - d/2 + d/n * \sum x_i]}$$

**Erläuterungen:**  $X_0$  = der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv reagieren  
 $d$  = der Dosisabstand in Logarithmus zur Basis 10  
 $n$  = die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte  
 $\sum x_i$  = die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich der bei  $X_0$ .

### 3.2.4 Reinheitskontrolle

**Brachyspiren-suspension.** Jede Brachyspirencharge wurde auf Kontaminationsfreiheit geprüft. Hierzu wurde ein Aliquot aufgetaut und für zwei Tage aerob in Serumbouillon und auf Blut-Agarplatten mit Schafblut und Gassner-Agarplatten sowie anaerob auf Zeissler- und Schädler-Agarplatten bebrütet. Beim Ausbleiben von makroskopisch erkennbarem Wachstum von anderen Keimen als den Brachyspiren wurde die Charge als kontaminationsfrei erklärt und zur Verwendung freigegeben.

**Impfantigene.** Aliquots der Impfantigene wurden aerob bei 37 °C in Serumbouillon und auf Blut-Agarplatten (Schaf) und Gassner-Agarplatten sowie anaerob auf Zeissler- und Schädler-Agarplatten bebrütet. Die Inkubationszeit der Platten betrug fünf, die der Serumbouillon 12 Tage bei 37 °C.

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Präparation von DNS aus Bakterienkulturen

**Plasmid-DNS.** Die Plasmidpräparation aus zuvor transformierten *E. coli*-Zellen (**Kapitel 3.3.7**) wurde unter Verwendung des „QIAGEN QiaPrep Spin Miniprep (Fa. Qiagen, Hilden)“ entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Erfolg wurde mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender DNS-Bestimmung überprüft. Die Präparation des Vektors pET-24b(+) erfolgte mittels „QIAGEN Plasmid Midi-Kit (25)“ (Fa. Qiagen, Hilden).

**PCR-Amplifikate.** Alle PCR-Produkte, die in der Klonierung oder Sequenzierung eingesetzt wurden, wurden mittels „QIAquick PCR Purification Kit (50)“ (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers (für die Verwendung einer Mikrozentrifuge) aufgereinigt.

### 3.3.2 DNS-Bestimmung

Die Konzentration der für die Ligations- und Transformationsansätze gewonnenen DNS wurde über Messungen im „Nano Drop 2000C“ Spektrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) ermittelt.

### 3.3.3 Restriktion von DNS

Vor der Ligation von Plasmid- und Insert-DNS wurde bei beiden Komponenten eine Restriktion mit *EcoRI* und *NdeI* (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) im Doppelverdau durchgeführt. Die Menge des eingesetzten Enzyms betrug bei Restriktion von Plasmid-DNS 10 U/μg DNS, bei PCR-Amplifikaten (Inserts) 5 U/μg DNS (*hlyA*), 10 U/μg DNS (*tlyB*) bzw. 7 U/μg DNS (alle anderen DNS-Fragmente). Nach Anweisung des Herstellers wurde die Reaktion in Puffer O (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) für 16 h bei 37 °C durchgeführt. Die Inserts BHWA1\_01870 und *tlyC* wurden aufgrund einer *EcoRI*-Schnittstelle im Genom einzeln verdaut. Der Verdau erfolgte mit *NdeI* für 16 h bei 37 °C, der Verdau mit *EcoRI* erfolgte im Anschluss bei 20 °C (BHWA1\_01870) bzw. 37 °C (*tlyC*) für 15 min mit einer Enzymkonzentration von 1 U/μg DNS. Die Kontrolle der DNS-Fragmente vor und nach Restriktion erfolgte in der Agarosegelelektrophorese.

### 3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung der verwendeten Inserts und Überprüfung transformierter Zellen auf ihren Plasmid- und Insertgehalt wurde die PCR eingesetzt. Mitgeführt wurden stets eine Negativkontrolle (mit A. dest) und die entsprechenden Positivkontrollen.

**Monoplex-PCR:** Es enthielt ein 30 μl Reaktionsansatz 1 U PanScript Polymerase, je 15 pmol der entsprechenden Primer (**Tabelle 7**), 133 μM je Nukleotid (Fa. PAN Systems, Aidenbach), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x NH<sub>4</sub>Mix und 3 μl der zu testenden Suspension (= Template). Die Bedingungen zur Amplifikation waren wie folgt: ein initialer Denaturierungsschritt (5 min, 94 °C), gefolgt von 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 s, einer Anlagerung für 30 s bei einer Primerspezifischen Temperatur von 50 °C bis 63 °C (**Tabelle 7**) und einer Verlängerung für 90 s bis 3 Min bei 72 °C. Nach dem abschließenden Verlängerungsschritt von 5 min bei 72 °C wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C gekühlt.

Die Monoplex-PCR wurde zur Überprüfung transformierter Zellen (mit Primern pET-A und pET-B, Anlagerung bei 66 °C, Verlängerung 2 min. bzw. 3 min bei Überprüfung von *tlyB*-Klonen), und zur Überprüfung des Genprofils (alle Gene außer *tlyB*) in verschiedenen *B. spp.* (Anlagerungstemperatur siehe **Tabelle 7**, Verlängerungszeit 90 s) eingesetzt. Zur Herstellung des Inserts *tlyB* wurde ebenfalls die Monoplex-PCR genutzt (Anlagerung bei 55 °C, Verlängerung 3 min).

**XL-PCR:** Ein 50 μl-Reaktionsansatz enthielt 1,6 U XL-Polymerase (*rTth*), je 16 pmol der entsprechenden Klonierungsprimer (**Tabelle 7**), Nukleotide (Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach) in einer Konzentration von je 320 μM, 1 x XL-Puffer (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA), 1,1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) und 1 μl Template. Das Template wurde zuvor im Verhältnis 1:2 mit A. dest. verdünnt und 10 min bei 100 °C erhitzt. Die Bedingungen zur Amplifikation waren dann wie folgt: auf einen initialen

Denaturierungsschritt (5 min, 94 °C) folgten 16 Zyklen mit 15 s Denaturierung bei 94 °C, und 5 min Anlagerung und Verlängerung bei 60 °C. Danach folgten weitere 16 Zyklen mit den gleichen Bedingungen, wobei in jedem Zyklus die Anlagerungs- und Verlängerungszeit um 15 s verlängert wurde. Abschließend wurde eine Verlängerung bei 72 °C für 7 min durchgeführt. Bis zur Entnahme wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

Die XL-PCR wurde für die Insertherstellung (alle Inserts außer *tlyB*) genutzt. Des Weiteren wurde sie bei der Überprüfung des Gens *tlyB* in verschiedenen *B. spp.* eingesetzt, wobei die Zeiten für Anlagerung und Verlängerung auf jeweils 9 min verlängert wurden.

### 3.3.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) hergestellt, mit Ausnahme der Sequenzierungsprimer T7-Prom und T7-Term, welche für die Sequenzierung von der Fa. LGC Genomics direkt den Ansätzen zugegeben wurden (**Tabelle 8**). Alle Primer der Firma MWG wurden als Stocklösungen (100 µM) und als Gebrauchslösungen (5, 10 und 20 µM) bei -20 °C gelagert. Um das jeweilige Zielgen (siehe **Tabelle 1** auf **Seite 7** und **Abbildung 23** auf **Seite 86**) exakt klonieren zu können wurden die Primer entsprechend modifiziert. Dabei wurde vor dem Startcodon eine *NdeI*-Schnittstelle eingefügt. Im Rückwärtsprimer wurde das Stopcodon zerstört und durch eine *EcoRI*-Schnittstelle ersetzt. So konnten exakt die Hämolyisin kodierenden Gene kloniert werden. Die Größe der jeweiligen PCR-Amplifikate ist zu entnehmen.

**Tabelle 6: Größe der PCR-Amplifikate von verschiedenen Hämolyisingenen von *B. hyodysenteria***

Amplifikat	Amplifikatgröße in Basenpaaren [bp]		
	PCR mit internen Primern		PCR mit umgreifen- den Primern
	vor Restriktion	nach Restriktion	
BHWA1_00962	1.320	1.301	1.524
BHWA1_01870	697	677	900
<i>hly</i>	1.356	1.337	1.560
<i>hlyA</i>	258	239	462
<i>tlyA</i>	747	728	951
<i>tlyB</i>	2.511	2.492	2.715
<i>ypIQ</i>	699	680	903
<i>tlyC</i>	831	812	903
<i>fabG</i>	771	752	975
<i>hlyA<sup>-</sup></i>	262	243	465
<i>fabG-hlyA-fabF</i>	2.424	2.405	2.628
<i>fabF</i>	1.278	1.259	1.482

Tabelle 7: Charakteristika der Primer zum Nachweis des Vektors sowie der Hämolyisogene von *B. hyodysenteriae*

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Organismus	Position <sup>1</sup>	Sequenz Nr.	Annealing-Temperatur
hlyA for	GAGAAATACATATGGCATTAATCGATGAAATTAAC	<i>hlyA</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	1.000-1.034	U94886	63 °C
hlyA rev	CGGAGCTCGAATTCCTTTTATGTTCTTCAATGATTTAG			1.218-1.257		
tlyA for	TACTAATACATATGCGATTAGATGAATATGTGCA	<i>tlyA</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	460-494	X61684	54 °C
tlyA rev	CGGAGCTCGAATTCGAAATAATAAAATGAGCTAAATATT			1.167-1.206		
tlyB for	AGGATTATCATATGTTTCAATTTTCATTTAAACAAG	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	85-119	X73140	55 °C
tlyB rev	CGGAGCTCGAATTCGAACTTTTAGATAAATTCCTTATTCT			2.556-2.595		
tlyC for	TCCGGGATCATATGCCAATAAAAAAATAATATCTAAGA	<i>tlyC</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	777-816	X73141	56 °C
tlyC rev	CGGAGCTCGAATTCGAATCTTATTTTGTGCTGATTTAT			1.566-1.605		
hly for	TTATTCTTTCATATGCTCTCTGCTTTTATTTCTGGAAGTG	<i>hly</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	704.846 - 704.884	NC_012225	59 °C
hly rev	CGGAGCTCGAATTCATTTAAAAATTTCTAAATCATTTTT			706.163 - 706.201		
962 for	GATCCGGGCATATGGATATATAATTATAATAATAGTGTAA	BHWA1_	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	1.122.691 - 1.122.652	NC_012225	56 °C
962 rev	CGGAGCTCGAATTCCTCAGTGTCTGAATCATCTTTTCAT	00962		1.121.371 - 1.121.410		
yplQ for	GGAGAAATACATATGGAGAAAAAGTGCTTTTATATCGA	<i>yplQ</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	504.408 - 504.371	NC_012225	50 °C
yplQ rev	CGGAGCTCGAATTCGAAATTTATAACATAGCTATATAAAA			503.709 - 503.748		
1870 for	GATAAAACCATATGAATGCTGATTTGAATAATAATA	BHWA1_	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	2.156.895 - 2.156.928	NC_012225	59 °C
1870 rev	GAATATAAGAAATTCGAGAAAAATGTTAGCAACATATCT	01870		2.156.233 - 2.156.271		
fabG-1-for	AAAGGGTACATATGGACTTAAATCTTAAAAATAAAACAGCT	<i>fabG-hlyA-fabF</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	178 - 218	U94886	nur XL-PCR
fabF-1-rev	CGGAGCTCGAATTCCTTATATCTTTTGAATACTATAGAA			2.563 - 2.601		
fabG-1-for	AAAGGGTACATATGGACTTAAATCTTAAAAATAAAACAGCT	<i>fabG</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	178 - 218	U94886	nur XL-PCR
fabG-2-rev	AAAAGATCGAATTCATTGACATTCGGCCGTCACACAG			913 - 948		
fabF-2-for	GAGTTTTACATATGAGTGAACGTAGAGTTGTAATTACGG	<i>fabF</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	1.323 - 1.361	U94886	nur XL-PCR
fabF-2-rev	CGGAGCTCGAATTCGATATCTTTTGAATACTATAGAAAG			2.562 - 2.600		
hlyA for	GAGAAATACATATGGCATTAATCGATGAAATTAAC	<i>hlyA</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B204	999-1.033	U94886	nur XL-PCR
hlyA-3	CGGAGCTCGAATTCCTTATTTTATGTTCTTCAATGTAT			1.223-1.261		
pET-A	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	MCS <sup>2</sup>	Vektor pET-24b(+)	63 - 87	Merck	66 °C
pET-B	CCCGCGAAATTAATACGACTCAC			336 - 313		

**Erläuterung:** 1) Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank; 2) MCS = "multiple cloning site" des Vektors pET-24b(+); **Merck** = Vektorsequenz der Fa. Merck KGaA, Darmstadt; die Schnittstellen sind unterstrichen.

Tabelle 8: Eigenschaften verschiedener Sequenzierungsprimer

Primerbezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Gen	Organismus	Position <sup>1</sup>	Sequenz Nr.
Hly-1	GAAGTGCTTTATCAAGTATGG	<i>hly</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	705.326 - 705.346	NC_012225
Hly-2	GCATATCACTAAATAAGCTGC	<i>hly</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	705.713 - 705.733	NC_012225
962-1	TGCAAGAGATAGGTGCTCC	BHWA1_00962	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	1.122.255 - 1.122.237	NC_012225
962-2	CTCATCTGTATACAAGACC	BHWA1_00962	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm WA1	1.121.767 - 1.121.750	NC_012225
tlyB-1	TGGAACAGACAAAGTCAGG	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	559-577	X73140
tlyB-3	GAAATATTGAATGGTATCAAAGG	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	1.167-1.196	X73140
tlyB-5	GTTTATGTTTGGAGACAGCG	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	1.802-1.828	X73140
tlyB-2	ATCTTTTCAGCAAGTCCCT	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	803-778	X73140
tlyB-4	GCATCTTCGAAATTCTGACTC	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	1.445-1.418	X73140
tlyB-6	ATCTCTTGACACCTAAGTTAC	<i>tlyB</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	2.121-2.095	X73140
fabF-3-for	TATGGAATATGGTATGAACGGACC	<i>fabF</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	1.789 - 1.812	U94886
fabF-4-rev	CAGCTATAACAAATCCGTCTCTTCC	<i>fabF</i>	<i>B. hyodysenteriae</i> , Stamm B 204	2.021 - 2.045	U94886
T7-Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	MCS <sup>2</sup>	Vektor pET-24b(+)	68 - 87	Merck
T7-Prom	TAATACGACTCACTATAGGG	MCS <sup>2</sup>	Vektor pET-24b(+)	307 - 326	Merck

**Erläuterungen:** 1) Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank; 2) MCS = "multiple cloning site" des Vektors pET-24b(+); **Merck** = Vektorsequenz der Fa. Merck KGaA, Darmstadt.

### 3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden horizontale Flachbettgele mit 1 bis 2 % Agarose (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) und 1 x TAE als Elektrophoresepuffer eingesetzt. Der Probenauftrag fand nach der Mischung der Einzelproben mit Ladepuffer (Berliner Blau) im Verhältnis 1:5 [v/v] statt. Zudem wurde ein Molekularmassenstandard in Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung mitgeführt (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fa. Fermentas, St. Leon Roth). Für die Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von ca. 10 V pro cm Elektrodenabstand für 40 bis 120 min angelegt.

Die Visualisierung und Fotodokumentation erfolgte mittels Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH (Typ RH-3) unter UV-Beleuchtung, nach Zusatz von Ethidiumbromid (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg). Bei der Untersuchung linearer DNS wurde Ethidiumbromid direkt der Agarose zugesetzt (0,02 µg/ml), während zirkuläre DNS nachträglich im Ethidiumbromid-Bad (2 mg/ml) angefärbt wurde.

### 3.3.7 DNS-Klonierung

**Herstellung kompetenter Zellen.** Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde das Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) in modifizierter Form verwendet. Nach Standardanzucht von BLR(DE3)-Zellen in LBM<sup>T</sup> wurde die Kultur im Verhältnis 1:100 [v/v] mit frischem LBM<sup>T</sup> verdünnt, bis zum Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> (Photometer DU-640, Beckman Instruments, München) von 0,4 bis 0,5 inkubiert (37 °C, 180 U/min) und dann 5 min auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4.000 x g, 4 °C, 10 min) und in eiskaltem TFB1-Puffer (1/2 des Ausgangsvolumens) resuspendiert. Nach Inkubation (auf Eis, 90 min) folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (4.000 x g, 4 °C, 10 min) mit anschließendem Resuspendieren des Pellets in TFB2-Puffer (1/15 des Ausgangsvolumens). Diese Suspension wurde in 200 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

**Ligation.** Der geschnittene Vektor und das geschnittene und gereinigte Insert wurden in 20 µl Ansätzen ligiert. Die Ansätze enthielten 1 x Ligationspuffer (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot), 1 U T4-Ligase (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot), 100 ng Vektor-DNS (Fa. Novagen durch Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) sowie Insert-DNS im molaren Verhältnis von 1:7 oder 1:10 (Vektor:Insert).

**Transformation.** Zur Transformation wurden die kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und für 20 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeimpuls von 90 s bei 42 °C wurde die Zellsuspension erneut für 2 min auf Eis gelagert. Danach wurde sie mit dem 4-fachen ihres eigenen Volumens mit LB-Medium versetzt und für

90 min bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LBA<sup>K<sup>T</sup></sup> ausplattiert und für 16 h bei 37 °C aerob inkubiert.

### **3.3.8 DNS-Sequenzierung**

Verschiedene Anbieter führen die Sequenzierung durch. Die Sequenzierung der Klone ADhlyA, ADyplQ und ADtlyA wurde von der Fa. GENterprise (Mainz) durchgeführt. Als Matrize für diese Sequenzierungsreaktion dienten aufgereinigte PCR-Amplifikate (Primer pET-A und pET-B) (**Kapitel 3.3.4**). Pro Sequenzierungsansatz wurden 100 bis 200 ng DNA und 10 pmol Primer eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 7 µl mit A. dest aufgefüllt.

Die Sequenzierung der restlichen Klone führte die Fa. LGC Genomics (Berlin) durch. Als Matrize wurde hier 10 µl Plasmid-DNS in einer Konzentration von 100 ng/µl eingesetzt. Die Standardsequenzierungsprimer T7-Prom und T7-Term setzte der Anbieter dem Sequenzierungsansatz zu.

## **3.4 Proteinanalytische Methoden**

### **3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Bestimmung der Proteinmenge diente der „BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit“ (Fa. Pierce, Bonn). Die im Elutionspuffer vorliegenden Proteine wurden zuvor mittels der Zeba<sup>TM</sup> Desalt Spin Columns (Fa. Pierce, Bonn) in PBS umgepuffert und anschließend steriltriftriert (Rotrand Filter, 0,2 µm, Fa. Whatman GmbH).

### **3.4.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)**

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels vertikaler SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli, 1970). Die Proben wurden mit der äquivalenten Menge Lämmli-Puffer versetzt und zur Denaturierung für 10 min im Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Proteine in einem 1 mm dicken, 4 %igen Polyacrylamidsammeln gel und einem 12,5 bzw. 16 %igen vertikalen Polyacrylamidtrenn gel über eine effektive Trennstrecke von 5,5 cm bei 45 Volt / Gel über 1,5 h aufgetrennt (Vertikalelektrophorese kammer Modell Minigel, Fa. Biometra, Göttingen). Zur Bestimmung der molaren Masse der Proteine wurde der Marker Page-Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt.

Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Einlegen des Gels in InstantBlue<sup>TM</sup> Lösung (Fa. Expedeon, Eching) für 1 Stunde bei RT. Abschließend wurden die Gele im Gel trockner (Gel dryer Model 543, Fa. Biorad, München) unter Vakuum getrocknet (80 °C, 2 h) und im Anschluss zum Zwecke der Dokumentation fotografiert.

### 3.4.3 Löslichkeitsanalysen von *E. coli*-Proteinen

Die Präparation der löslichen Proteinfractionen im *E. coli*-Bakterienzellysat erfolgte nach den Anweisungen im pET-Manual (The QIAexpressionist, 5<sup>th</sup> Edition). Die Präparationen wurden anschließend mittels analytischer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und zum Zwecke der Dokumentation fotografiert.

### 3.4.4 Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen an einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix

#### Native Reinigung

Nach IPTG-Induktion (**Tabelle 5**) wurden die *E. coli*-Klone ADhlyA, ADtlyA, ADtlyB und ADtlyC für 5 min auf Eis gelagert, dann bei 4.000 x g für 20 min zentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Die weitere Verarbeitung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers für native Bedingungen (The QIAexpressionist, 5<sup>th</sup> Edition), außer dass anstatt vier sechs Eluatfraktionen gewonnen wurden. Diese wurden in einer SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt analysiert (**Kapitel 3.4.1**). Angaben zu den einzelnen Proteinen sind der **Tabelle 9** zu entnehmen. Die Säulen wurden entsprechend der Herstelleranweisung regeneriert und bei 4 °C gelagert. Die Proteine wurden für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

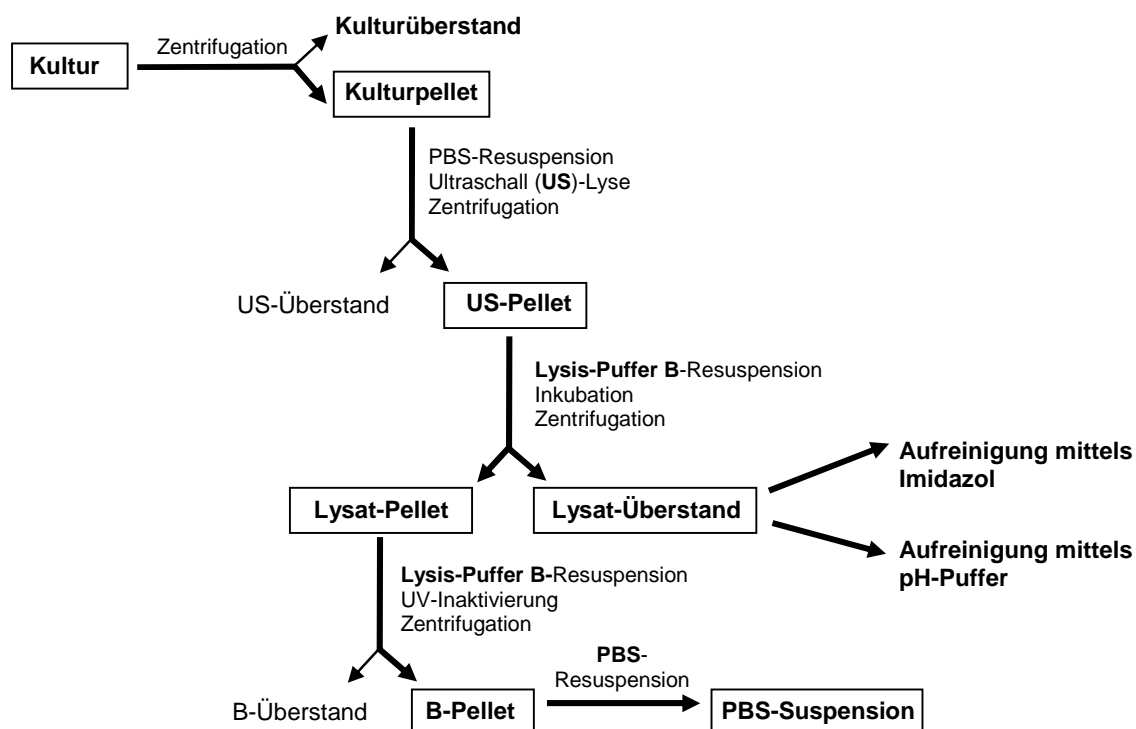
**Tabelle 9:** Erwartete Größe der rekombinant hergestellten Hämolyse von *B. hyodysenteria*

Protein	Anzahl Aminosäuren			Molekulargewicht in kDa
	gesamt	davon Linker	davon His-Tag	
rHlyA-His	97	13	6	11,0
rTlyA-His	260	14	6	29,1
rTlyB-His	848	14	6	95,5
rTlyC-His	288	14	6	33,0
r962-His	451	13	6	50,2
rYplQ-His	244	14	6	27,9
r1870-His	243	14	6	27,7
rHly-His	463	13	6	53,2
rFabG-His	269	14	6	28,8
rFabF-His	437	14	6	46,7
rFabG/HlyA/FabF	249 / 78 / 417	-	-	26,5 / 8,9 / 44,5
rHlyA	78	-	-	8,9



### Reinigung der exprimierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen

Die IPTG-induzierte *E. coli*-Bakterienkultur des Klons AD962 wurde nach entsprechender Inkubationszeit (**Tabelle 5**) für 5 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4.500 x g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 Vol PBS (entspricht 2 % des Ausgangsvolumens) resuspendiert, im Eiswasserbad mittels Ultraschall (US) lysiert (Branson Sonifier Cell Disruptor B15, Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd, 6 x 10 s mit jeweils 10 s Pause zwischen den Zyklen) und anschließend zentrifugiert (4.500 x g, 20 min). Das US-Pellet wurde mit 1 Vol Lysis-Puffer B resuspendiert, für eine Stunde bei 37 °C mit 160 U/min inkubiert und anschließend zentrifugiert (10.000 x g für 20 min). Der Lysat-Überstand wurde affinitätschromatographisch gereinigt und das Lysat-Pellet erneut mit 1 Vol Lysis Puffer B resuspendiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach Inaktivierung des Lysat-Pellets mittels UV-Licht (UV-Stratalinker 1800, Fa. Stratagene, Waldbronn) (drei Zyklen mit je 8 KJ) folgte eine weitere Zentrifugation (10.000 x g für 20 min). Das B-Pellet wurde in PBS resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Die Präparationsschritte und die Bezeichnungen der einzelnen Fraktionen sind der **Abbildung 4** zu entnehmen.



**Abbildung 4:** Präparationsschritte und Bezeichnung der r962-His Fraktionen im Rahmen der Reinigung

**Reinigung mittels Imidazol:** Die mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gepackte Säule wurde mit Lysis-puffer-B äquilibriert und danach der Lysat-Überstand aufgetragen. Nach dem Durchlauf wur-

de die Säule zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen und das gebundene Protein danach sechsmal mit je 0,5 ml Elutionspuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden getrennt aufgefangen und nach SDS-Elektrophorese und Westernblot auf ihren Proteingehalt überprüft.

**Reinigung mittels pH-Puffer:** Alternativ zur Elution mittels Imidazol wurde ebenfalls eine Reinigung mittels pH-Wert Absenkung durchgeführt (The QIAexpressionist, 5<sup>th</sup> Edition). Hierfür wurde zum Äquilibrieren der Säule Lysispuffer-B verwendet, zum Waschen der pH-Waschpuffer und zur Elution der pH-Elutionspuffer. Das restliche Protokoll entsprach der Aufreinigung mittels Imidazol.

### 3.4.5 Herstellung von HE-Extrakten

Für die Herstellung der Extrakte diente der ***B. hyodysenteriae*-Stamm B204**. Es wurden je 100 ml des Stamms unter Standardbedingungen angezüchtet und nach dreitägiger Inkubation die Zellen mittels Zentrifugation (10.000 x g, 30 min, 4 °C) geerntet. Die Weiterverarbeitung der Pellets erfolgte nach einem der drei folgenden Protokollen:

- a) B204-PBS-Extrakt:** Das Pellet wurde gewogen und mit der 20fachen Menge PBS resuspendiert und auf Eis mittels Ultraschall lysiert (3x3 Zyklen zu je 20 s mit jeweils 20 s Pause).
- b) B204-HE-Extrakt:** Das Pellet wurde mit der errechneten Menge (**Formel 2**) HE-Puffer resuspendiert und danach für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert (Kent et al., 1988).
- c) B204-HE-US-Extrakt:** Zusätzlich zum HE-Extrakt erfolgte in diesem Protokoll nach der 30 minütigen Inkubation eine Lyse der Zellen auf Eis mittels Ultraschall (6x10 s mit jeweils 10 s Pause).

Alle Ansätze wurden im Anschluss zentrifugiert (4.240 x g, 10 min, 4 °C), der gewonnene Überstand filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C, -20 °C, bzw. -70 °C gelagert.

Zur Herstellung entsprechender Extrakte aus den ***E. coli*-Klonen** wurden die Bakterien zunächst im 100 ml Ansatz unter Standardbedingungen angezüchtet und mit IPTG induziert (**Tabelle 5**). Nach Zentrifugation der Ansätze (10.000 x g, 30 min, 4 °C) erfolgte die Herstellung der Extrakte nach den oben angegebenen Protokollen b oder c. Als Kontrollen wurden entsprechend behandelte Präparationen des Stammes BLR(DE3, pET-24b(+)) und des hämolysierenden *E. coli*-Feldisolates 3306/05 mitgeführt.

**Formel 2:** Menge an HE-Puffer in ml = 
$$\frac{OD * 100}{20}$$

**Erläuterungen:** OD = OD<sub>600 nm</sub> der induzierten Kulturen.

### 3.4.6 Proteinfällung aus dem Überstand

Nach dem Zentrifugieren einer *B. hyodysenteriae*-Stamm B204-Kultur (6.000 x g, 4 °C, 10 min) wurden 2 ml des Überstandes mit 18 ml Aceton versetzt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei -20 °C. Nach einer weiteren Zentrifugation (6.000 x g, 4 °C, 10 min) wurde das Pellet zweimal mit je 0,5 ml 80 %igem Aceton gewaschen. Das Sediment wurde anschließend mit 0,5 ml Aceton resuspendiert und nochmals abzentrifugiert (6.000 x g, 4 °C, 10 min). Nach vollständiger Trocknung des Pellets wurde dieses in 100 µl PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 3.5 Serologische Methoden

### 3.5.1 Konjugate

Die in dieser Arbeit verwendeten Konjugate sowie ihre Gebrauchsverdünnungen sind in der **Tabelle 10** aufgeführt.

### 3.5.2 Serumabsorption

Verschiedene Seren wurden vor Verwendung im Versuch mit dem Stamm BLR (DE3, pET-24b(+)), bzw. mit dem *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 präabsorbiert. Die Stämme wurden hierfür unter Standardbedingungen bis zu einer Zellzahl von  $10^9$  KbE/ml angezüchtet und mittels Zentrifugation geerntet (6.000 x g, 4 °C, 10 min). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Suspension auf  $2 \times 10^{10}$  KbE/ml eingestellt und mittels Erhitzen auf 80 °C für 10 min inaktiviert.

Die zu absorbierenden Seren wurden auf ihre Gebrauchskonzentration verdünnt, im Verhältnis 1:1 (v/v) mit den Bakterien gemischt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Gemische bei 15.000 x g für 5 min abzentrifugiert und die Überstände im Test eingesetzt.

**Tabelle 10: Für die Serologie verwendete Konjugate und ihre Gebrauchsverdünnung**

Konjugat	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
ECL™ Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	1:1.000	Fa. GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Katalog-Nr. NA934V
Ni-NTA HRP Conjugate	1:5.000	Fa. Qiagen, Hilden, Katalog-Nr. 34530
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Swine IgG (H+L)	1:1.000	Fa. Dianova, Hamburg, Katalog-Nr. 114-035-003

### 3.5.3 Westernblot

**Transfer.** Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (**Kapitel 3.4.2**) wurden mittels Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Fa. Whatman GmbH, Dassel) übertragen. Dazu wurde nach dreißigminütiger Vorinkubation der auf Gelgröße zugeschnittenen Nitrocellulosemembran in PBS und nach Äquilibration des SDS-PAGE-Gels in Anodenpuffer II die Elektroblokkammer (Modell BF-M, Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) luftblasenfrei folgendermaßen bestückt: sechs in Anodenpuffer I eingelegte Filterpapiere (Fa. MAGV, Rabenau-Londorf), drei mit Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, das SDS-PAGE-Gel und letztlich neun, in Kathodenpuffer eingelegte Filterpapiere. Nach Schließung der Kammer folgte der Proteintransfer bei konstanten  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  auf Nitrocellulosemembran (RT, 100 min). Im Anschluss wurde das Gel zum Nachweis des vollständigen Transfers der Proteine in InstantBlue™ Lösung (Fa. Expedeon, Eching) gefärbt (1 h, RT) und die Nitrocellulosemembran bis zur weiteren Verwendung in PBS (4 °C) eingelegt.

**Detektion.** Nach Inkubation der Membran in Peptonblockpuffer (Fa. Roche Diagnostics, Penzberg, 1:10 in A. dest. verdünnt) bei RT für 1 h, folgten drei Waschschrte in PBS-Tween (20 ml, RT, 5 min). Dann wurde die Membran in 10 ml Ni-NTA HRP Konjugat (1:5.000 in PBS-Tween) inkubiert (RT, 1 h). Nach zwei Waschschrten mit PBS-Tween (20 ml, RT, 1 min) und zwei mit PBS (20 ml, RT, 1 min) wurden die Proteinbanden durch Zugabe von Substratlösung angefärbt. Diese Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit A. dest. beendet. Anschließend wurden die Membranen bei Raumtemperatur auf Filterpapier getrocknet und zum Zwecke der Dokumentation fotografiert.

### 3.5.4 Immunoblot

Die Charakterisierung der hergestellten Antiseren fand im Immunoblot statt. Die Durchführung entsprach weitestgehend der im Kapitel „Westernblot“ beschriebenen Methode. Allerdings wurde im Immunoblot als erster Antikörper das zu testende Kaninchenantiserum bzw. Schweineserum eingesetzt und nach einstündiger Inkubationszeit mit PBS-Tween 3 x 5 min (RT) gewaschen. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers (ECL™ Anti-rabbit IgG-POD bzw. Goat Anti-Swine IgG-POD, **Tabelle 10**) in einer Verdünnung von 1:1000 [v/v] wurde das oben beschriebene Protokoll fortgeführt. Als Antigen kamen sowohl die einzelnen Impfantigene, als auch Ganzzelllysate des Ursprungsstammes B204 (Standardanzucht, abzentrifugiert bei  $2.710 \times g$  für 10 min, gewaschen und resuspendiert in PBS, gekocht mit Lämmli-Puffer) und, zum Nachweis der serotypübergreifenden Wirksamkeit der Antiseren, die übrigen acht Serotyp-Referenzstämme zum Einsatz.

### 3.5.5 Verwendete Seren

Die in dieser Arbeit verwendeten Kaninchen- und Schweineseren sind in **Tabelle 11** und **Tabelle 12** aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:100, bzw. 1:500 (Serum CH 1243 und CH 1244), bzw. 1:1.000 (CH 1245) eingesetzt.

**Tabelle 11: Für die Serologie und biologischen Assays verwendete polyklonale Antiseren von Kaninchen**

Antiserum	Spezifikation	Herkunft
CH 083	nach 5facher Immunisierung mit Ganzzelllysate von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204	IHIT
CH 1242	nach 5facher Immunisierung mit rHlyA-His	diese Arbeit
CH 1243	nach 5facher Immunisierung mit rTlyA-His	diese Arbeit
CH 1244	nach 5facher Immunisierung mit rTlyB-His	diese Arbeit
CH 1245	nach 5facher Immunisierung mit rTlyC-His	diese Arbeit
CH 1247	nach 5facher Immunisierung mit Negativkontrolle	diese Arbeit

**Erläuterungen:** **Negativkontrolle** = aufgereinigtes Eluat einer Proteinexpression vom leeren Vektor (Stamm BLR (DE3, pET-24b(+))), **IHIT** = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere.

## 3.6 Zellkulturmethoden

### 3.6.1 Kultivierung und Archivierung der Zellen

Als Medium für die Kultivierung der Zellen wurde ausschließlich MEM Earle's-Medium (Fa. Biochrom, Berlin, Katalog-Nr. FG 4815) unter Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin (Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 5 % FBS (Fa. PAN Biotech GmbH, Aidenbach) verwendet.

**Tabelle 12: Für die Serologie und biologischen Assays verwendete polyklonale Antiseren von Schweinen**

Spezifikation				
Serum	Tier	Gruppe	Versuchstag	Herkunft
CH 088	1560	<b>Gruppe A</b> (3malige Belastung mit Stamm B204 (ca. 10 <sup>9</sup> KbE/Dosis))	26 Tage vor Belastung	Dr. S. Sattler, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena*
CH 137			am Tag der Belastung	
CH 220			14 Tage nach Belastung	
CH 271			30 Tage nach Belastung	
CH 089	1561	<b>Gruppe A</b> (3malige Belastung mit Stamm B204 (ca. 10 <sup>9</sup> KbE/Dosis))	26 Tage vor Belastung	
CH 138			am Tag der Belastung	
CH 221			14 Tage nach Belastung	
CH 272			30 Tage nach Belastung	
CH 092	1568	<b>Gruppe A</b> (3malige Belastung mit Stamm B204 (ca. 10 <sup>9</sup> KbE/Dosis))	26 Tage vor Belastung	
CH 141			am Tag der Belastung	
CH 222			14 Tage nach Belastung	
CH 265			24 Tage nach Belastung	
CH 273			30 Tage nach Belastung	
CH 528	1461	<b>Kontrollgruppe</b> (3malige Belastung mit Placebo (BHI-Medium))	13 Tage vor Belastung	
CH 576			am Tag der Belastung	
CH 662			14 Tage nach Belastung	
CH 692			30 Tage nach Belastung	
CH 530	1464	<b>Gruppe A</b> (3malige Belastung mit Stamm B204 (ca. 10 <sup>9</sup> KbE/Dosis))	13 Tage vor Belastung	
CH 578			am Tag der Belastung	
CH 664			14 Tage nach Belastung	
CH 702			30 Tage nach Belastung	
CH 534	1468	<b>Gruppe A</b> (3malige Belastung mit Stamm B204 (ca. 10 <sup>9</sup> KbE/Dosis))	13 Tage vor Belastung	
CH 582			am Tag der Belastung	
CH 666			14 Tage nach Belastung	
CH 703			30 Tage nach Belastung	
AS	Antiserum-Mischung aus 8 Feldseren Dysenterie-rekonvaleszenter Schweine			Dr. N. Rudolph, Wabern

**Erläuterungen:** \* = Seren aus Infektionsversuchen (Sattler, 2010)

**Auftauen und Pflege der Zellen.** Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in Kryotubes (Cryo.s, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) in flüssigem Stickstoff. Als Einfriermedium kam „cryo-safe I“ (Fa. C.C.Pro, Oberdorla) zur Anwendung. Zur Rekultivierung der Zellen wurden die Kryotubes im Wasserbad (37 °C) bis zum Auftauen des Inhalts geschwenkt. Alle weiteren Arbeiten fanden unter Reinraumbedingungen statt. Nach Desinfektion der äußeren Oberfläche der Kryotubes mit Ethanol (75 %, Fa. Merck, Darmstadt), diente eine Einmalpipette (1 ml) zur Überführung der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß (50 ml). Unter vorsichtigem

Schwenken wurden 10 ml warmes Medium hinzugesetzt und die Zellen abzentrifugiert (200 x g, 20 °C, 7 min). Der Überstand wurde verworfen und nach vorsichtigem Resuspendieren des Zellpellets in 10 ml Medium folgte ein zweiter Waschschrift. Letztlich konnten die erneut in 10 ml Medium resuspendierten Zellen in eine Zellkulturflasche (easy-flask 25V/C, Fa. Nunc, Wiesbaden) übertragen werden. Nach der mikroskopischen Kontrolle auf Zellgehalt und -morphologie wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luftfeuchte). Alle zwei Tage wurde nach vorhergehender mikroskopischer Kontrolle ein Mediumwechsel vorgenommen. Das Volumen an Medium belief sich auf 10 ml (40 ml-Zellkulturflasche). Für die Versuche wurden die Passagen 4 bis 15 (IPEC-J2-Zellen), Passage 117 (CRFK-Zellen) und Passage 18 (MDCK-Zellen) verwendet.

**Subkultivierung der Zellen.** Zur Subkultivierung wurde ein auf 35 bis 37 °C vorgewärmter VT-Puffer (Versen-Trypsin-Puffer, Fa. C.C.Pro, Oberdorla) verwendet. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Medium dekantiert und der Zellrasen zweimal mit VT-Puffer gewaschen, um Mediumreste vom Zellrasen zu entfernen und so die Wirkung des Trypsins zu optimieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit 1 ml VT-Puffer für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luftfeuchte) bis zur sichtbaren Ablösung der Zellen von der Grundfläche der Kulturgefäße. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 20 ml MEM-Earls-Medium aufgefüllt und auf zwei Flaschen verteilt. Für Toxizitätsversuche an Epithelzellen wurde der Ansatz mit 30 ml Medium aufgefüllt und je 1 ml/Abteil eingesetzt.

### 3.6.2 Toxizitätstests

#### **Zytotoxische Aktivität an Darm- und Nierenepithelzellen**

Als Zellkultur für diese Versuche dienten Monolayer der IPEC-J2-, CRFK- und MDCK-Zellen (Konfluenzrate 80 - 100 %) in Chamberslides (Lab-Tek® II CC2 System, Fa. Nunc, Wiesbaden, Kat-Nr. 154917) mit chemisch modifizierter Oberfläche. Nach einem einmaligen Waschschrift der Zellkulturen mit MEM-Earls-Medium (1 ml pro Abteil, 1 x 2 min) wurden die Zellen nach Dekantieren des Mediums mit den rekombinanten Proteinen (einzeln und in Kombinationen) bzw. dem B204-HE-Extrakt inokuliert (je 0,2 ml pro Abteil). Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C inkubiert und nach 30, 60 und 120 min sowie nach 20 h mikroskopisch im Invertoskop kontrolliert. Bei allen Versuchen wurde eine Negativkontrolle (MEM-Earls-Medium) mitgeführt. Als Maß für die Zytotoxizität wurde der Anteil an abgerundeten Zellen in Prozent zur Gesamtzahl der Zellen angegeben.

### Hämolyse-Assay

Für die Hämolyse-Assays wurden gewaschene Schafererythrozyten (10 % in PBS) verwendet. Neben den aufgereinigten rHämolysinen wurden auch die verschiedenen HE-Extrakte (**Kapitel 3.4.5**) getestet.

Die 10 %ige Erythrozytensuspension wurde jeweils im Verhältnis 1:2 [v/v] mit den Testsuspensionen gemischt und für 24 h bzw. vier Tage aerob bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (2.000 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Alle Versuche wurden im Doppelansatz und mindestens einem Wiederholungsansatz durchgeführt. Kam es zwischen den Versuchen zu einer Abweichung der Werte von > 20 % wurde der Doppelansatz nochmals wiederholt. Die hämolytische Aktivität der Proben wurde mittels photometrischer Messung der freigesetzten Hämoglobinmenge bei 540 nm im Überstand bestimmt. Als positive Kontrollen wurden hämolysierende Extrakte eines *E. coli*-Wildtyps (Stamm 3306/05) und der hämolysierende B204-HE-Extrakt und als Negativkontrolle PBS mitgeführt. Zur Induktion einer 100 %igen Hämolyse diente Triton X 100 (0,1 % in PBS). Der B204-HE-Extrakt wurde für die Versuche soweit verdünnt, dass ein Hämolysegrad von 60-80 %, bezogen auf den Triton X –Wert, erzielt wurde. Prozentuale Werte unter 5 % Hämolyse wurden als negativ gewertet.

Der Grad der Hämolyse in % wurde mit der **Formel 3** berechnet:

**Formel 3:**      **Hämolyse %** =  $\left( \frac{\text{OD der Probe} - \text{OD der Positivkontrolle}}{\text{OD der Positivkontrolle} - \text{OD der Negativkontrolle}} \right) * 100$

**Erläuterungen:** OD: optische Dichte bei 540 nm

**Versuche zur Hemmung der hämolytischen Aktivität an Erythrozyten:** Hierfür wurde der Hämolyse-Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Vor der Zugabe der Erythrozyten wurden dem B204-HE-Extrakt verschiedene Konzentrationen von polyklonalen Antiseren gegen die rHämolysine von Kaninchen (**Tabelle 11**), bzw. Schweineseren aus dem Infektionsversuch (**Tabelle 12**) im Verhältnis 1:2 [v:v] zugegeben. Nach 2-stündiger Inkubation wurde der hemmende Effekt prozentual zur Kontrolle (B204-HE-Extrakt 1:2 [v:v] mit HE-Puffer gemischt) berechnet.

## 3.7 Tierexperimentelle Methoden

### 3.7.1 Tierhaltung

Die Haltung der Kaninchen erfolgte über den Versuchszeitraum in Einzelboxen (60 cm breit, 63 cm hoch und 85 cm tief) auf Streu. Gefüttert wurde neben Heu ein pelletiertes Alleinfuttermittel (Hasfit plus, Raiffeisen) ad libitum, die Wasserversorgung war über Flaschentränken



sichergestellt. Nach Einstellung wurde den Tieren bis zum Beginn der Versuche eine Eingewöhnungszeit von 17 Tagen gewährt.

### 3.7.2 Herstellung der Impfstoffe

Zur Gewinnung von spezifischen Antiseren gegen die rekombinant hergestellten Hämolsine von *B. hyodysenteriae* wurden die affinitätschromatografisch aufgereinigten Proteine rHlyA-His, rTlyA-His, rTlyB-His, rTlyC-His sowie eine entsprechende Präparation des Stammes BLR (DE3, pET-24b(+)) als Kontrolle über Zeba™ Desalt Spin Columns (Fa. Pierce, Bonn) in PBS zunächst umgepuffert. Bei der Charge des Proteins rTlyB-His wurde zuvor mittels Amicon-Säulen (Amicon Ultra-15, 50.000 NMWL, Fa. Millipore, Schwalbach) das Gesamtvolumen der Fraktion eingeeengt. Nach Filtration (0,2 µm) wurde der Proteingehalt bestimmt (**Kapitel 3.4.1**) und mittels Zusatz von sterilem PBS eingestellt. Das alternativ aufgereinigte Proteingemisch r962 (**Kapitel 3.4.4**) wurde mittels UV-Strahlung inaktiviert (3 Zyklen mit je 8 J). Dieser Impfdosis wurde kein PBS zugesetzt.

Für die Immunisierung wurde das Antigen mit dem gleichen Volumen  $\text{Al}_2(\text{OH}_3)$  versetzt. Die Impfstoffe sind **Tabelle 13** zu entnehmen. Vor Anwendung am Tier wurden alle Impfantigene einer Reinheitskontrolle unterzogen (**Kapitel 3.2.4**).

**Tabelle 13: Für die Impfung der Kaninchen eingesetzte Antigenpräparationen**

Impfantigene	Adjuvans	Antigenmenge je Tier und Impfung	Gesamtvolumen
rHlyA (in PBS)	$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$	50 µg	400 µl
rTlyA (in PBS)	$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$	50 µg	400 µl
rTlyB (in PBS)	$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$	50 µg	400 µl
rTlyC (in PBS)	$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$	50 µg	400 µl
r962	$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$	235 µg	400 µl
Negativkontrolle	$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$	1,5 µg	400 µl

**Erläuterungen:** **Negativkontrolle** = aufgereinigtes Eluat einer Proteinexpression von Stamm BLR (DE3, pET-24b(+));  **$\text{Al}_2(\text{OH}_3)$**  = Alu-Gel-S (Aluminiumhydroxid), Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg, Kat-Nr. 12261.

### 3.7.3 Herstellung rHämolsin-spezifischer Antiseren im Kaninchen

Der Tierversuch war gem. § 8 Abs. 7, Nr. 2 (Impfungen, Blutentnahmen oder sonstige diagnostische Maßnahmen nach bereits erprobten Verfahren zur Erkennung insbesondere von Krankheiten, Körperschäden usw. bei Mensch oder Tier) des Tierschutzgesetzes, in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2936), genehmigungsfrei. Der Versuch wurde nach § 8a Abs. 1 und 2 dem Regierungspräsidium Gießen mit Datum vom 31.10.07 angezeigt.

Für die Herstellung der benötigten Antiseren wurden sechs neun Wochen alte, weibliche Kaninchen der Rasse „weiße Neuseeländer“ an den Tagen 1, 14, 21, 28 und 56, nach vorheriger Blutabnahme von 2 ml bis 4 ml aus der Vena auricularis caudalis, mit den zuvor hergestellten Impfstoffen (**Kapitel 3.7.2**) subkutan (s.c.) und intramuskulär (i.m.) immunisiert. Zusätzlich wurde an den Tagen 35 und 63 eine weitere Blutprobe entnommen. Am 70. Versuchstag wurden die Tiere unter Verwendung von Ketamin (25 mg/kg KG, i.m., Selectavet Dr. Otto Fischer, Weyarn-Holzolling) und Xylazin (5 mg/kg KG, i.m., Fa. CP-Pharma, Burgdorf) in Narkose gelegt. Nach Feststellung eines hyporeflektorischen Lidreflexes bei normoreflektorischem Cornealreflex fand die Tötung der Kaninchen unter Blutentzug zwecks terminaler Blutentnahme statt. Die Blutproben wurden nach etwa einstündiger Ruhezeit bei Raumtemperatur für 10 min bei 1.300 x g abzentrifugiert (u. U. auch mehrfach) und das Serum in ein neues Gefäß überführt. Die Lagerung der Sera erfolgte bei -20 °C.

### **3.8 Datenhaltung und Auswertung**

#### **3.8.1 Bilddokumentation und Auswertung**

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese wurden mit dem Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH, Typ RH-3 (Fa. Herolab, Wiesloch) unter UV-Beleuchtung sowohl fotografisch als auch digital festgehalten. Die Ergebnisse von SDS-PAGE und Westernblot/Immunoblot wurden mit der Digitalkamera Casio Exilim (Fa. Casio, Norderstedt) festgehalten.

#### **3.8.2 Auswertung von DNS-Sequenzdaten**

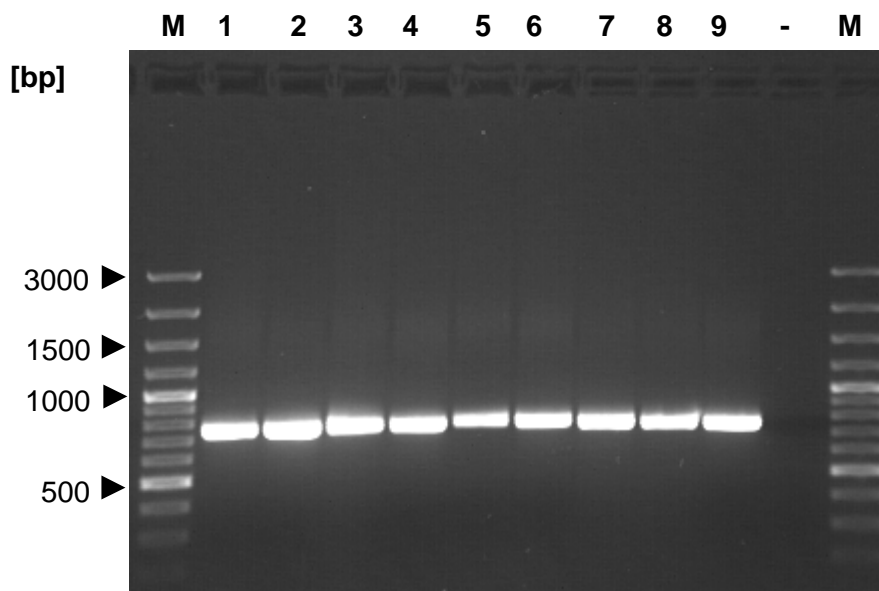
Die Sequenz-Rohdaten wurden mit Hilfe des Software-Pakets „Lasergene 2000®“ (Fa. Dnastar Ltd., London, UK) aufgearbeitet und analysiert. Primersequenzen für die PCR und Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Programm „Oligo®“ Version 4.0 (Fa. MedProbe, Oslo, Norwegen) ermittelt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Vorkommen verschiedener Hämolysingene bei *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämmen

Vor Beginn der Herstellung rekombinanter Hämolysine von *B. hyodysenteriae* wurde mittels PCR geprüft, ob mit dem Vorhandensein entsprechender Gene (*hlyA*, *tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, BHWA1\_00962, BHWA1\_01870, *ypIQ*, *hly*) bei *B. hyodysenteriae* zu rechnen ist.

Via PCR konnten alle acht Gene in jedem der untersuchten Serotyp-Referenzstamm (B78, B204, B169, A1, B8044, B6933, ACK300/8, Vic2 und NSW1) nachgewiesen werden. Exemplarisch ist dies in **Abbildung 5** am Beispiel des *tlyA*-Nachweises gezeigt.



**Abbildung 5:** Elektropherogramm der Insertspezifischen pET-PCR der Serotyp-Referenzstämmen mittels *tlyA*-spezifischer Primer

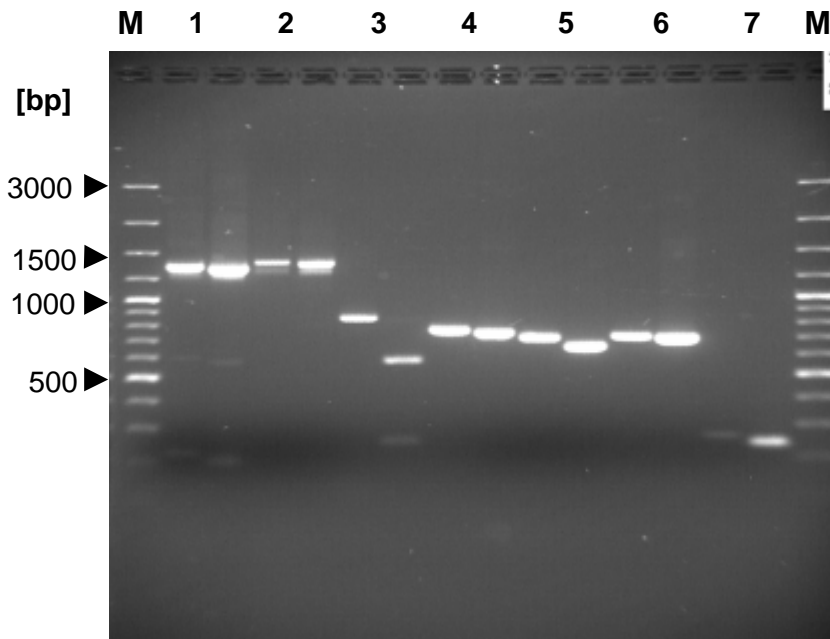
**Erläuterungen:** 1,5 %iges TAE-Agarosegel nach Etidiumbromid-Färbung.  
**1** = B78, **2** = B204, **3** = B169, **4** = A1, **5** = B8044, **6** = B6933, **7** = Ack300/8, **8** = Vic2, **9** = NSW 1, **-** = Negativkontrolle, **M** = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus), **bp** = Basenpaare.

### 4.2 Klonierung und Expression der *B. hyodysenteriae*-Hämolysingene in *E. coli*

#### 4.2.1 Klonierung

Die für vier Hämolysine sowie vermeintlicher Hämolysine von *B. hyodysenteriae*-kodierenden Gene (*hlyA*, *tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, sowie *hly*, *ypIQ*, BHWA1\_00962, BHWA1\_01870), sowie die flankie-

renden Gene von *hlyA* (*fabG* und *fabF*) wurden aus dem *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 mittels PCR amplifiziert, restringiert, mit dem geschnittenen Vektor pET-24b(+) ligiert und anschließend in *E. coli* (Stamm BLR(DE3)) kloniert. Um die rekombinanten Proteine für die spätere Immunisierung von Kaninchen in reiner Form gewinnen zu können, wurde am carboxyterminalen Ende der Genprodukte ein im pET-24b(+)-Plasmid kodierter Histidin-Marker (His-Tag) angefügt. Eine entsprechende Modifikation wurde durch die eingesetzten Primer erreicht. (siehe **Kapitel 3.3.5** auf Seite **31**). Die erfolgreiche Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6:** Agarosegelelektrophorese der Inserts jeweils vor und nach Restriktion mit *NdeI* und *EcoRI*

**Erläuterungen:** 1,5 %iges TAE-Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung. unverdautes und verdautes (*EcoRI* und *NdeI*) Amplifikat sind jeweils nebeneinander aufgetragen: **1** = BHWA1\_00962, **2** = *hly*, **3** = *tlyC*, **4** = *tlyA*, **5** = BHWA1\_01870, **6** = *yplQ*, **7** = *hlyA*.

Wie aber auch in der Abbildung 6 deutlich wird, lag in der jeweiligen Gensequenz des *tlyC* (Spuren 3) und des BHWA1\_01870 (Spuren 5) eine zusätzliche *EcoRI*-Schnittstelle vor. Daher wurde hier in weiteren Ansätzen eine Restriktion durchgeführt, bei der die *EcoRI*-Menge sowie die Restriktionszeit und -dauer variiert wurden. Die Transformanten ADhlyA<sup>-</sup> und ADfabUm wurden ohne His-Tag kloniert, in dem das Stopcodon nicht zerstört, sondern in die entsprechenden Primer integriert wurde (**Tabelle 7**).

Erfolgreich transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf LBA<sup>KT</sup> selektiert. Zur Überprüfung der Inserts wurden Monoplex-PCRs mit den Primern pET-A und pET-B durchgeführt. Abschließend wurden die positiven Transformanten doppelsträngig sequenziert.

Alle, in die Untersuchung einbezogenen, Hämolyzingene wurden erfolgreich kloniert. **Abbildung 7** und **Abbildung 8** zeigen die Transformanten nach umgreifender PCR. Dies belegt die Präsenz des jeweiligen Plasmids in den *E. coli*-Zellen.

Bei der durchgeführten Sequenzierung stellte sich heraus, dass neun der 12 Transformanten in der Aminosäuresequenz mutationsfrei waren. Einzig die Transformanten ADfabF, ADtlyB und ADtlyC enthielten jeweils eine (ADfabF und ADtlyC), bzw. zwei Nukleotidmutationen (ADtlyB), die zu je einer Mutation in der Aminosäuresequenz führten. Die **Tabelle 14** fasst die Ergebnisse der Sequenzierung zusammen.

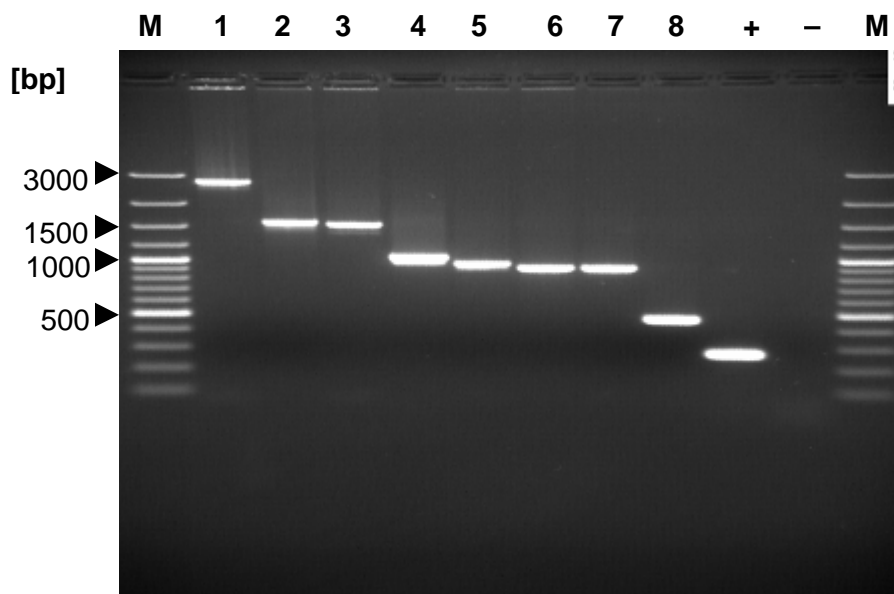
**Tabelle 14:** Nukleotid- und Aminosäuremutationen der Hämolyzingene nach Klonierung in *E. coli*

Klon	Insert	Nukleotid-mutation <sup>1)</sup>	Position	Aminosäure-mutation <sup>1)</sup>	Position
ADhlyA	<i>hlyA</i>	keine	-	-	-
ADtlyA	<i>tlyA</i>	keine	-	-	-
ADtlyB	<i>tlyB</i>	a → g	590	E → G (Glu → Gly)	197
		a → g	1.423	K → E (Lys → Glu)	475
ADtlyC	<i>tlyC</i>	a → g	770	K → R(Lys → Arg)	257
AD962	BHWA1_962	keine	-	-	-
ADhly	<i>hly</i>	keine	-	-	-
ADyplQ	<i>ypIQ</i>	a → c	23	keine	-
AD1870	BHWA1_1870	t → c	449	keine	-
ADfabG	<i>fabG</i>	keine	-	-	-
ADfabF	<i>fabF</i>	a → g	223	D → G (Asp → Gly)	75
ADhlyA <sup>-</sup>	<i>hlyA<sup>-</sup></i>	keine	-	-	-
ADfabUm	<i>fabF-hlyA-fabG</i>	keine	-	-	-

**Erläuterungen:** <sup>1)</sup> Vergleich mit der Sequenz vom *B. hyodysenteriae*-Stamm B204, Stanton 2010, persönliche Mitteilung.

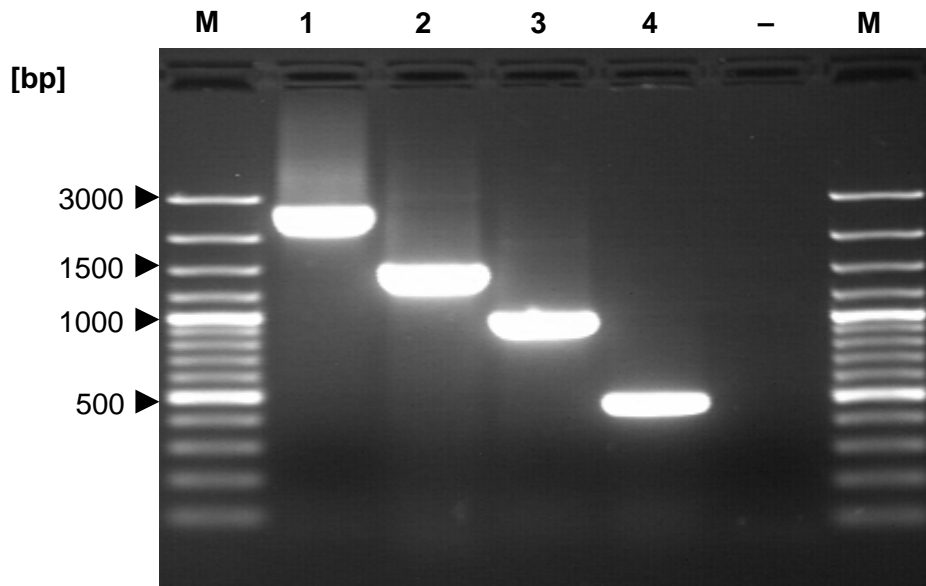
#### 4.2.2 Klonierungsstrategie für die HlyA-Transformanten

Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur (Hsu et al., 2001), dass Transformanten mit *fabG-hlyA-fabF*-Inserts hämolytische Aktivität aufweisen, wurden weitere Transformanten generiert. Die Genkarten der Transformanten sind schematisch in der **Abbildung 23** auf Seite **86** dargestellt. Da der Beginn und teilweise auch das Ende der Transformanten von Hsu und Kollegen (2001) nicht näher charakterisiert wurden, sind diese Bereiche in der Grafik nicht durchgehend gezeichnet.



**Abbildung 7** Elektropherogramm der insertumgreifenden pET-PCR der Hämolysin-Transformanten

**Erläuterungen:** 1,5 %iges TAE-Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung.  
**1** = ADtlyB, **2** = ADhly, **3** = AD962, **4** = ADtlyC, **5** = ADtlyA, **6** = ADyplQ,  
**7** = AD1870, **8** = ADhlyA,  
**+** = Positivkontrolle (leerer ungeschnittener Vektor), **-** = Negativkontrolle,  
**M** = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus),  
**bp** = Basenpaare



**Abbildung 8** Elektropherogramm der Insertumgreifenden pET-PCR der HlyA-Transformanten

1,5 %iges TAE-Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung.  
**1** = ADfabUm, **2** = ADfabF **3** = ADfabG **4** = ADhlyA<sup>-</sup>,  
**-** = Negativkontrolle, **M** = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder Plus), **bp** = Basenpaare.

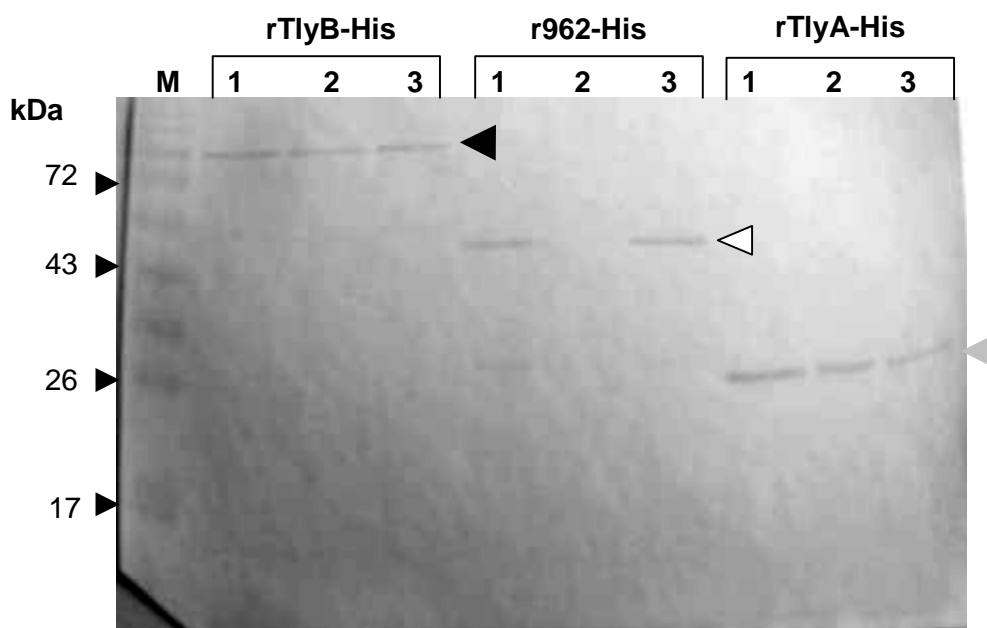
### 4.2.3 Proteinexpression und -reinigung

Die Proteine rHlyA-His, rTlyA-His, rTlyB-His und rTlyC-His stellten sich als löslich, das Protein r962-His jedoch als unlöslich dar (**Abbildung 9**). Entsprechend wurde bei den löslichen Proteinen das Protokoll für native Bedingungen angewendet, für die Gewinnung des Proteins r962-His dagegen das Protokoll für denaturierende Bedingungen (**Kapitel 3.4.4**).

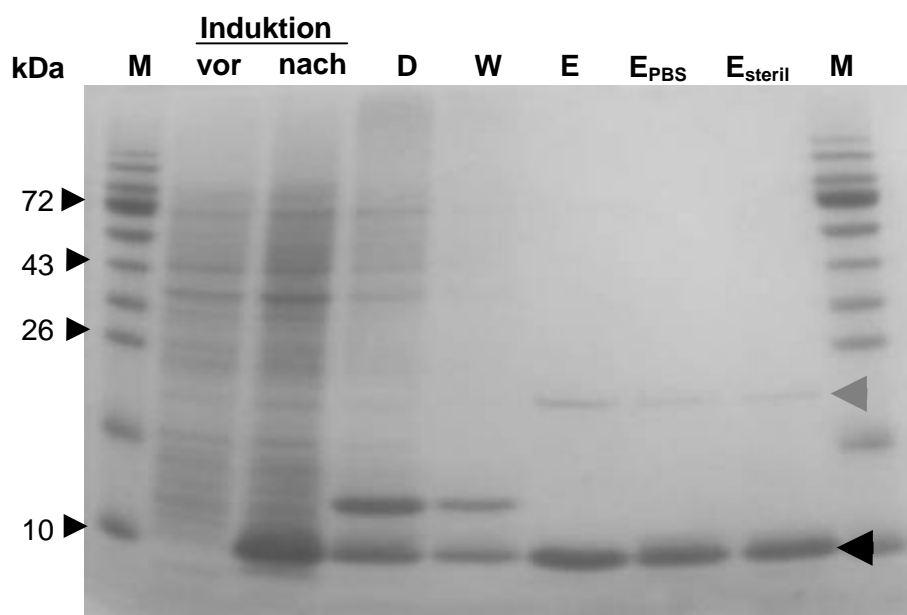
**rHlyA-His und rTlyA-His:** Die Proteine waren nach Expression und Reinigung im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE als deutliche Banden in der zu erwartenden Größe (**Tabelle 9**) zu erkennen. Die höchsten Proteinkonzentrationen lagen in den Eluatfraktionen 2-5 vor. Mittels Ni-NTA-HRP Konjugat konnte die rTlyA-His-entsprechende Bande im Westernblot erwartungsgemäß dargestellt werden. Beim rHlyA-His trat im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE und im Westernblot eine Bande in der Größe von etwa 22 kDa auf (**Abbildung 10**). In der erwarteten Größe des rHlyA-His von 11 kDa war im Westernblot jedoch keine Bande darstellbar.

**rTlyB-His und rTlyC-His:** Die Proteine rTlyB-His und rTlyC-His konnten ebenfalls exprimiert und gereinigt werden. Allerdings traten in allen Eluatfraktionen im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE weitere Banden unterschiedlicher Größe auf. Im Westernblot wurden diese Banden beim rTlyC-His nicht nachgewiesen. Allerdings zeigten sich im Westernblot beim rTlyB-His-Protein zwei zusätzliche Banden zwischen 50 und 60 kDa sowie jeweils eine Bande von 15 bzw. 200 kDa.

**r962-His:** Das Protein r962-His war nach Expression nur im Westernblot mittels Ni-NTA-HRP detektierbar, während in der SDS-PAGE nach **Coomassie-Färbung** keine prominente Bande dargestellt werden konnte. Die affinitätschromatografische Reinigung nach Vorgaben des Herstellers führte stets zu dem nahezu vollständigen Verlust des Proteins (**Abbildung 11**). Alternativ wurde das Protokoll für denaturierende Bedingungen angewendet. In **Abbildung 11A** ist deutlich zu erkennen, dass das Protein exprimiert wird, jedoch war das Protein auch nach Aufspaltung der Zellen mittels Harnstoff und Ultraschall in nur sehr geringen Mengen in der löslichen Fraktion (Spur 5) vorhanden. Die affinitätschromatographische Reinigung dieser löslichen Fraktion (Lysatüberstand) führte sowohl bei der Elution mittels Imidazol (**Abbildung 11B**) als auch mittels pH-Wertabsenkung (**Abbildung 11C**) zu dem Verlust des Proteins bereits in der Durchflussfraktion (Nachweis im Westernblot, **Abbildung 11B und C**). Daher wurde das Lysatpellet (Spur 6, **Abbildung 11A**) nach dem letzten Zentrifugationsschritt mit PBS resuspendiert. In dieser Fraktion war das Protein mit Ni-NTA-HRP im Westernblot detektierbar. Allerdings wurden im Coomassie gefärbten SDS-PAGE auch viele Proteinbanden des Empfängerorganismus nachgewiesen. Für alle Versuche mit gereinigten Proteinen stand r962-His daher nicht zur Verfügung.



**Abbildung 9:** Detektion von rTlyB-His, r962-His und rTlyA-His mittels Ni-NTA-HRP-Konjugat nach SDS-PAGE und Westernblot.  
 1: Gesamtproteinfraktion, 2: lösliche Fraktion, 3: unlösliche Fraktion, M = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).  
 ◀ = rTlyB-His, ◁ = r962-His, ◄ = rTlyA-His.



**Abbildung 10:** Elektropherogramm der Fraktionen im Rahmen der affinitätschromatografischen Reinigung des rHlyA-His.  
 16 %iges SDS-PA-Gel nach Coomassie-Färbung. Probenauftrag entspricht ca. 2 µg Gesamtprotein pro Spur.  
**Proben:** D = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Eluat, E<sub>PBS</sub> = Eluat umgepuffert in PBS, E<sub>steril</sub> = Eluat nach Sterilfiltration, M = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder),  
 ▶ = rHlyA-His (11 kDa), ◄ = rHlyA-His-Zusatzbande (~22 kDa).

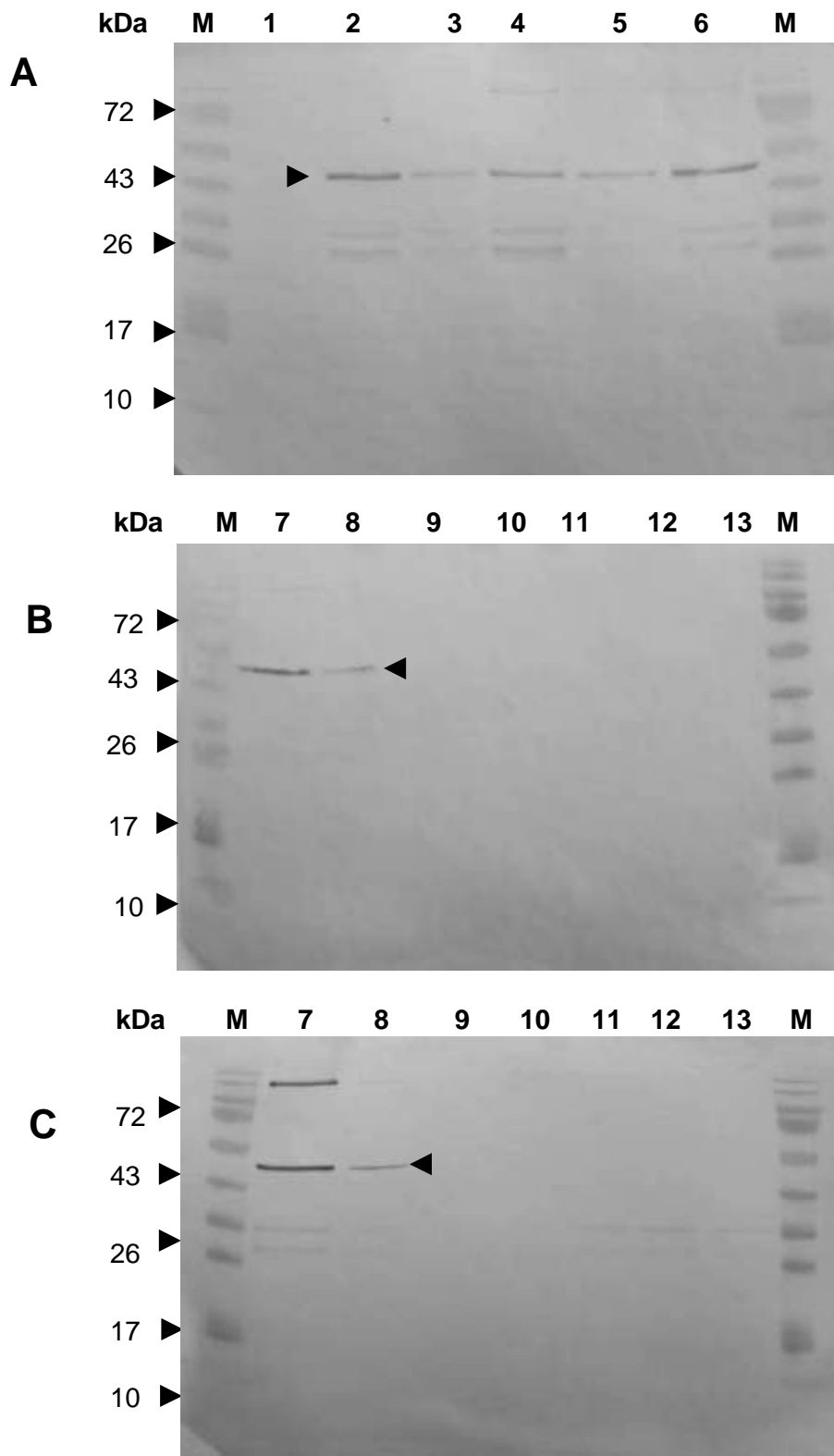


**r1870-His, rYplQ-His und rHly-His;** Die Proteine r1870-His, rYplQ-His und rHly-His waren unter Verwendung der hier dargestellten Methoden (**Kapitel 4.2.4**) nicht in einer detektierbaren Menge exprimierbar.

**rFabUm, rFabG-His, rFabF-His und rHlyA<sup>-</sup>:** Bei der Induktion der Transformanten kam eine IPTG-Konzentration von 125 µM zum Einsatz. Das rFabG-His- und das rHlyA<sup>-</sup>-Protein zeigten sich im Coomassie gefärbten SDS-PAGE auf der erwarteten Größe als dominierende Proteinbande. Bei Induktion des umgreifenden Klon ADfabUm waren Proteine im Bereich von etwa 9 kDa und 26 kDa sichtbar. Diese entsprechen, gemessen an ihrem Molekulargewicht, den Proteinen rFabG und rHlyA<sup>-</sup>. Das rFabF-His-Protein war im Coomassie gefärbten SDS-PAGE nicht detektierbar, dagegen aber im Westernblot mithilfe des Ni-NTA-HRP-Konjugats als Bande in der erwarteten Größe. In Präparationen der Transformanten ADhlyA<sup>-</sup> und ADfabUm konnten im Immunoblot, unter Verwendung des Serums CH 1242 (gegen rHlyA-His gerichtetes Kaninchenantiserum, **Tabelle 11**), jeweils Banden im Bereich von etwa 9 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht der Größe des HlyA-Proteins. Weiterhin fiel auf, dass mit dem polyklonalen Serum bereits bei der nicht induzierten Kontrolle des Klon ADhlyA eine sehr schwache Bande dieser Größe auftrat. In **Abbildung 13** sind die Ergebnisse der Expression der Transformanten ADhlyA<sup>-</sup> und ADfabUm dargestellt.

**Negativkontrolle** (Produkt einer Proteinexpression von Stamm BLR(DE3, pET-24b(+)). Die Negativkontrolle wies sowohl im Coomassie gefärbten-SDS-PAGE als auch im Westernblot mit Ni-NTA-HRP-Konjugat keinerlei Banden auf.

Alle gereinigten Proteine wurden in PBS umgepuffert und filtriert (0,2 µm) (**Abbildung 12**).

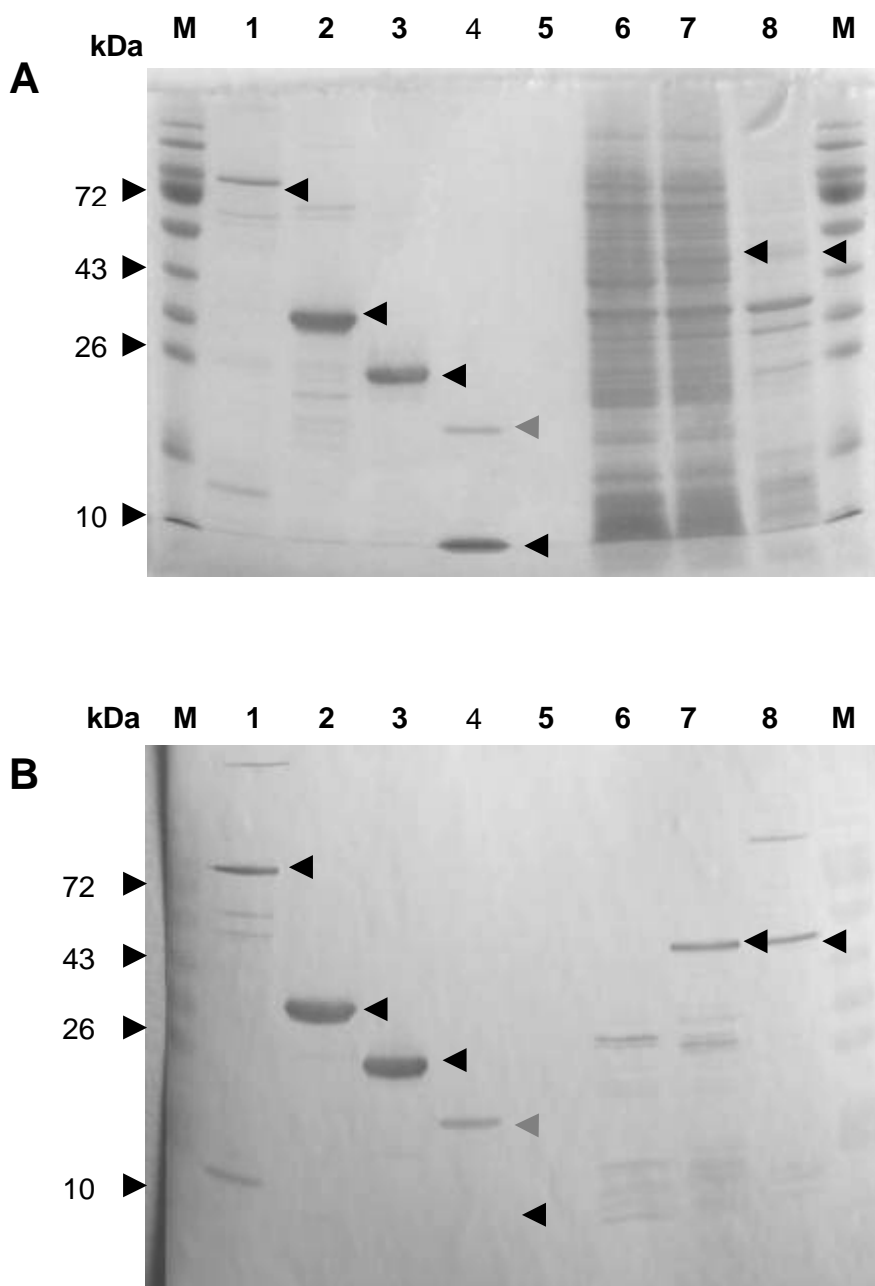


**Abbildung 11: Detektion (Ni-NTA-HRP-Konjugat) nach Westernblot der r962-His Fraktionen im Rahmen der Reinigung.**

**A:** Lysatherstellung, **B:** Imidazol-Reinigung, **C:** pH-Reinigung.

**1** = Kultur vor Induktion; **2** = Kultur nach Induktion; **3** = Ultraschall-Überstand; **4** = Ultraschall-Pellet; **5** = Lysat-Überstand; **6** = Lysat-Pellet; **7** = Durchfluss; **8** und **9** = Waschfraktion 1, 2; **10** bis **13** = Eluatfraktionen 1 bis 4, **M** = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder);

▶ = r962-His Protein.

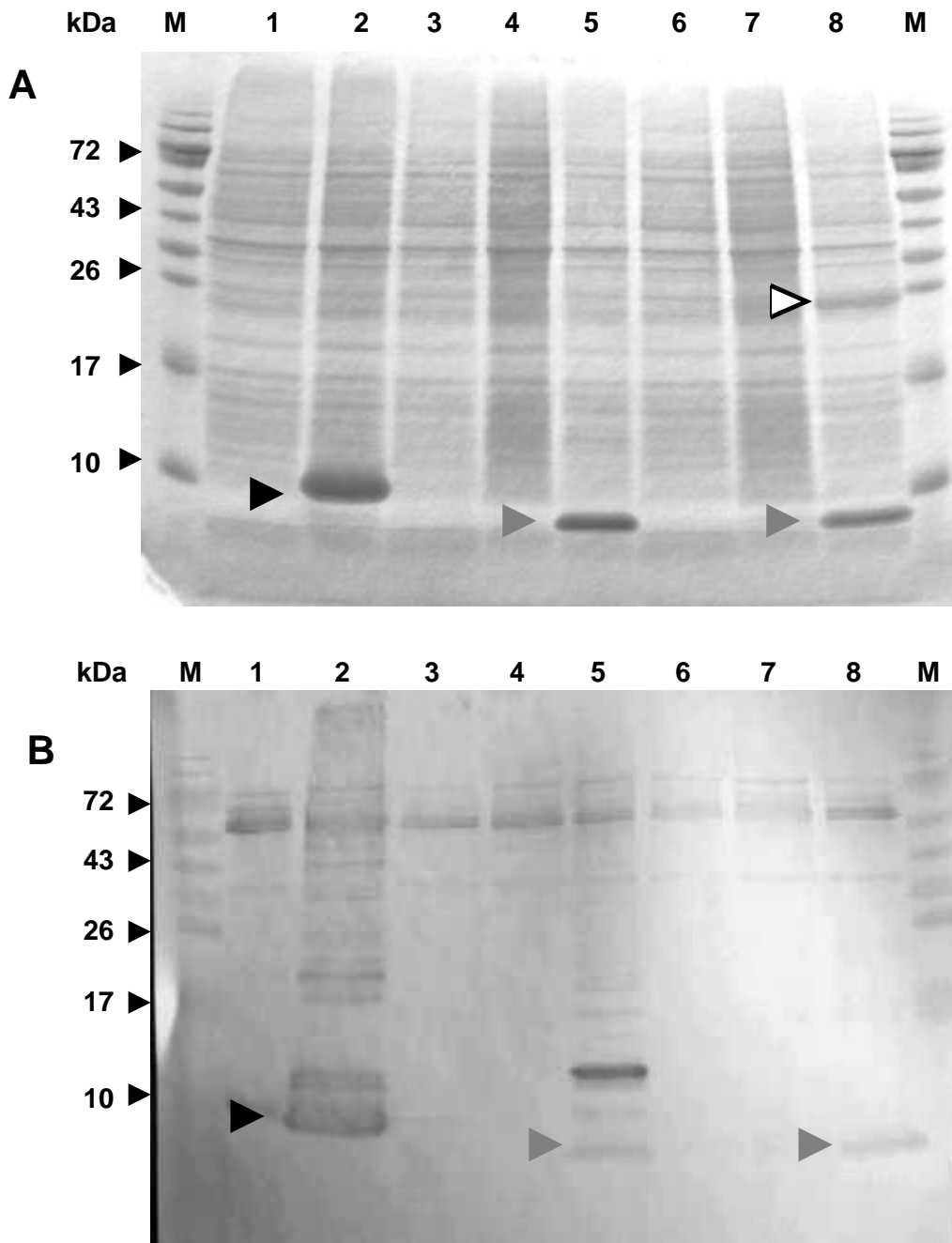


**Abbildung 12: Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE (A) und Immunodetektion (Ni-NTA-HRP Konjugat) nach Westernblot (B) der umgepufferten und filtrierten rekombinanten Proteine**

Probenauftrag entspricht ca. 2 µg Gesamtprotein pro Spur.

1 = rTlyB-His, 2 = rTlyC-His, 3 = rTlyA-His, 4 = rHlyA-His,  
 5 = Negativkontrolle, 6 = r962-His vor Induktion, 7 = r962-His nach  
 Induktion, 8 = r962-His PBS-Suspension,  
 M = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).

◀ = jeweiliges rekombinantes Protein, ◀ = rHlyA-His-Zusatzbande.



**Abbildung 13: SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) (A) und Immunoblot (B) zum Nachweis des HlyA-His und HlyA-Proteins in verschiedenen Induktionsansätzen mittels des Serums CH 1242 (Anti-rHlyA-His).**

Probenauftrag entspricht ca.  $7,5 \cdot 10^7$ /KbE pro Spur

**1** = ADhlyA vor Induktion, **2** = ADhlyA nach Induktion **3** = ADhlyA<sup>-</sup> vor Induktion, **4** = ADhlyA<sup>-</sup> ohne Induktion, **5** = ADhlyA<sup>-</sup> nach Induktion mit 125  $\mu$ M IPTG, **6** = ADfabUm vor Induktion, **7** = ADfabUm ohne Induktion, **8** = ADfabUm nach Induktion mit 125  $\mu$ M IPTG, **M** = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder);

▶ = rHlyA-His, ▶ = rHlyA<sup>-</sup> (ohne His-Tag) ▷ = rFabG-Protein.

#### 4.2.4 Optimierung der Proteinexpression

**Versuche zur Optimierung der Expression von r1870-His, rHly-His und rYplQ-His.** Die Proteine r1870-His, rHly-His und rYplQ-His wurden in unterschiedlichen Medien, bei unterschiedlicher Wachstumstemperatur und –dauer, mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert.

Bei Anzucht der Kulturen in LBM<sup>KT</sup> kam es, vor allem bei dem Stamm AD1870, zu einem verminderten Wachstum der Transformanten nach einer Induktion mit 1 mM IPTG. Dieser Effekt konnte auch durch eine Anzucht bei nur 30 °C nicht vermindert werden. Bei einer Anzuchttemperatur von nur 23 °C trat diese Wachstumsdepression nicht mehr auf. Es konnten jedoch in keinem der Ansätze Proteine in der erwarteten Größe detektiert werden. Nach Detektion von drei Banden in einer Größe von 17-26 kDa bei Induktion des Stamms ADhly, wurde dieser bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 2,0 vermehrt und im Anschluss für 30, 60 und 120 min mit 250 und 1.000 µM IPTG induziert. Auch der Stamm AD1870 wurde bei einer OD<sub>600 nm</sub> von 2,0 mit 1.000 µM IPTG für 60 min induziert. Die Kulturen unterschieden sich in ihrer Dichte nach Induktion nicht von Kulturen ohne Induktion. Dennoch waren die erwarteten Proteine nicht detektierbar. Über eine Anzucht der Stämme in LBM<sup>KT</sup>, das nicht autoklaviert wurde, sollte eine mögliche Basalexpression der Proteine unterdrückt werden. Auch in diesen Ansätzen kam es zu einem verminderten Wachstum der induzierten Kulturen ohne Expression des gewünschten Proteins. Die Anzucht der Stämme in M9<sup>KT</sup>-Medium (Minimalmedium) und nicht autoklaviertem BHI<sup>KT</sup>-Medium führte, bei einer Induktion mit 1 mM IPTG, ebenfalls zu einer Wachstumsdepression. Eine Induktion mit geringeren IPTG-Konzentrationen (15,6 µM in LBM<sup>KT</sup>, 7,8 µM in M9<sup>KT</sup>- und BHI<sup>KT</sup>-Medium) hatte zwar keine Wachstumsdepression mehr zur Folge, die gewünschten Proteine waren jedoch auch hier nicht nachweisbar. In **Tabelle 15** sind die Expressionsversuche zusammenfassend dargestellt.

#### 4.2.5 Proteingehalte der exprimierten und gereinigten rekombinanten Hämolysin-Präparationen

Die nach dem Umpuffern und der Sterilfiltration der exprimierten und anschließend affinitätschromatographisch gereinigten rekombinanten Hämolysine (rHämolysine) sind in der **Tabelle 16** aufgelistet. Bei dem Vergleich der Proteinmenge je Liter Ausgangskultur wird deutlich, dass bei der Expression von rTlyB-His die geringste und bei der Expression des rHlyA-His die größte Menge an Proteine exprimiert wurde.

**Tabelle 15: Variationen in den Versuchsbedingungen zur Expression der Proteine r1870-His, rHly-His und rYplQ-His**

Maßnahme	angewendet bei	Proteinexpression
Anzucht bei 23 °C bzw. 30 °C	ADyplQ, AD1870	negativ
Anzucht in nicht autoklaviertem LBM <sup>KT</sup>	ADyplQ, AD1870	negativ
Anzucht in BHI <sup>KT</sup> mit Induktion über 4 h bzw. 20 h	ADyplQ, AD1870, ADhly	negativ
Anzucht in M9 <sup>KT</sup> mit Induktion über 4 h bzw. 20 h	ADyplQ, AD1870, ADhly	negativ
IPTG-Zugabe bei OD <sub>600 nm</sub> 2,0 der Hauptkultur	AD1870, ADhly	negativ
Induktionsdauer verkürzt (30, 60 und/oder 120 min)	AD1870, ADhly	negativ
Induktion mit IPTG-Konzentrationen < 10 µM	ADyplQ, AD1870, ADhly	negativ

**Tabelle 16: Proteingehalte der Chargen an rekombinanten Hämolysinen**

rekombinante Hämolysine	Proteinkonzentrationen der Extrakte	
	in der Proteinpräparation [µg/ml]	bezogen auf die Ausgangskultur [µg/ml]
rHlyA-His	275	10,6
rTlyA-His	339	2,3
rTlyB-His	378	0,5
rTlyC-His	488	2,0
r962-His GZL	1.173	9,7
Negativkontrolle (Expressionsprodukt des leeren Vektors)	~10	n. b.

**Erläuterungen:** n. b. = nicht bestimmt.

### 4.3 Ergebnisse der Immunisierungsversuche

#### 4.3.1 Immunantwort von Kaninchen nach Immunisierung mit rHämolysinen von *B. hyodysenteriae*

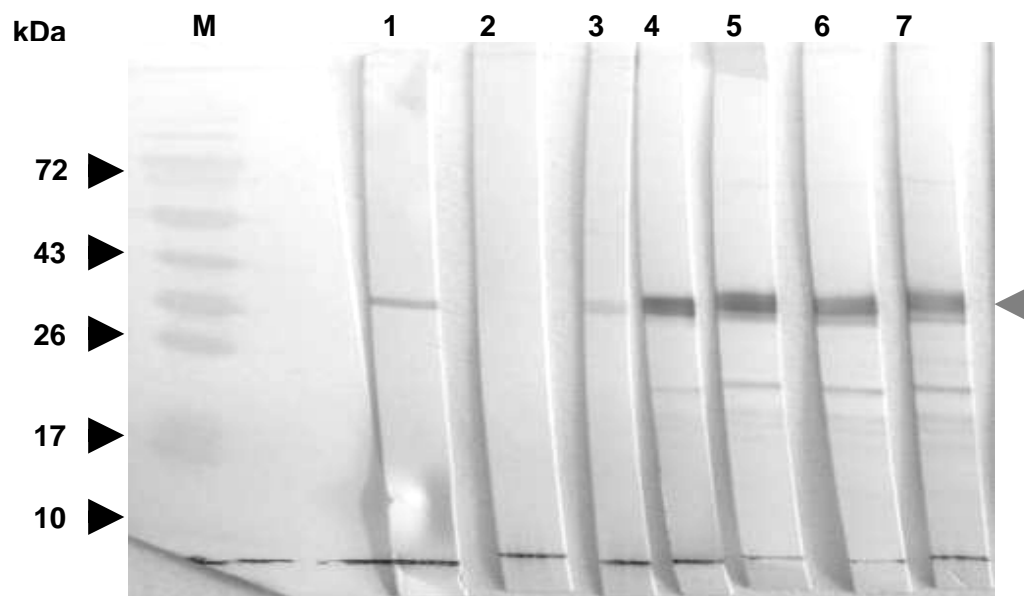
Nach der Impfung mit den rHämolysinen konnten bei allen Kaninchen Antikörper gegen das homologe Antigen im Immunoblot detektiert werden. Einzig das Serum des Kontrolltieres zeigte weder eine Reaktion mit dem eingesetzten Impfantigen noch mit einem Ganzzelllysat des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204. Die **Tabelle 17** zeigt den Verlauf der Serokonversion

bei den Kaninchen. Die **Abbildung 14** zeigt die Serokonversion am Beispiel des mit rTlyC-His-geimpften Kaninchens.

**Tabelle 17:** Verlauf der Antikörperbildung im Kaninchen gegen das Impfantigen nach Immunisierung mit rHämolysinen von *B. hyodysenteriae*

Versuchs- tag	Reaktion der homologen Antiseren mit den rHämolysinen (Signalstärken im Immunoblot)				
	rHlyA-His	rTlyA-His	rTlyB-His	rTlyC-His	r962-His
1	-	-	-	-	-
14	-	-	-	+	- <sup>1</sup>
21	- <sup>2</sup>	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
28	- <sup>2</sup>	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
35	+ <sup>2</sup>	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
56	+ <sup>2</sup>	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
63	++ <sup>2</sup>	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
70	++ <sup>2</sup>	+++	+++ <sup>1</sup>	+++ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>

**Erläuterungen:** - = negativ, + = schwache Reaktion, ++ = mittelgradige Reaktion, +++ = starke Reaktion, **1)** Vorkommen nicht spezifischer Banden, **2)** Reaktion mit der Zusatzbande auf ~ 22 kDa.



**Abbildung 14:** Serokonversion bei einem Kaninchen nach Immunisierung mit gereinigtem rTlyC-His im Immunoblot.

Einsatz des Antiserums 1:1.000 [v/v], **Antigen** = Impfantigen rTlyC-His (20 µg Gesamtprotein/Blot),

**1** = Ni-NTA-HRP-Konjugat; **2-7** = Kaninchenantiseren, **2** = vor 1. Immunisierung; **3** = nach 1. Immunisierung; **4** = nach 2. Immunisierung; **5** = nach 3. Immunisierung; **6** = nach 4. Immunisierung, **7** = finales Antiserum nach 5. Immunisierung (CH 1245), **M** = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). ◀ = rTlyC-His

Die gegen r962-His gerichteten Antiseren konnten nur nach Serumabsorption durch den leeren Vektorstamm (Stamm BLR(DE3, pET-24b(+))) ausgewertet werden. Es trat zwar eine spezifische Reaktion mit dem r962-His-Protein auf, weitere Untersuchungen mit dem Serum konnten jedoch aufgrund der hohen Antikörperdichte gegen Bestandteile des Vektors nicht durchgeführt werden. Auch das gegen rTlyB-His gerichtete Serum wurde, aufgrund des Auftretens einiger zusätzlicher Banden, nur nach Absorption von Antikörpern gegen *E. coli*-Proteine mit dem Stamm BLR(DE3, pET-24b(+)) eingesetzt. Bei den gegen rHlyA-His, rTlyA-His und rTlyC-His gerichteten Seren wurde diese Maßnahme nicht durchgeführt.

#### 4.3.2 Serologische Kreuzreaktionen zwischen den rHämolysinen

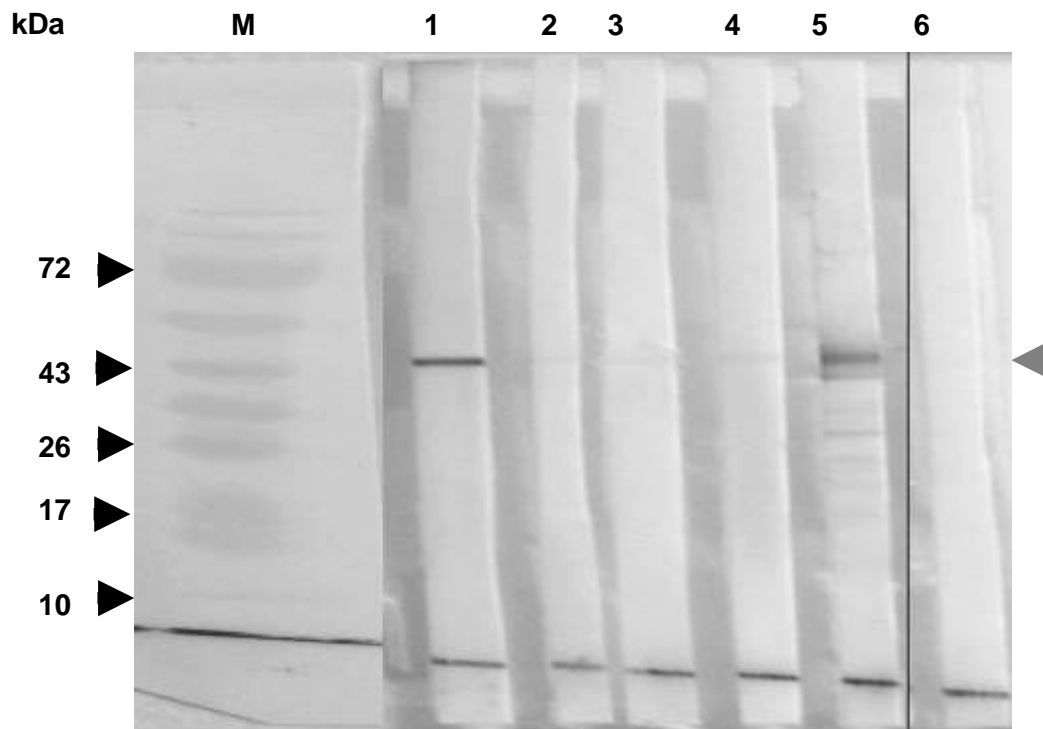
Neben den homologen Reaktionen der Seren gegenüber dem jeweiligen rHämolysin-Impfantigen kam es auch zu heterologen Reaktionen. So reagierte das gegen rTlyC-His gerichtete Serum auch schwach mit den anderen rHämolysinen. Entsprechend schwach ausgeprägte Banden waren auch bei allen heterologen Antiseren mit dem rTlyC-His-Antigen vorhanden. Diese Ergebnisse sind in der **Tabelle 18** zusammengefasst und in **Abbildung 15**, am Beispiel der Reaktionen mit dem rTlyC-His Antigen, dargestellt.

**Tabelle 18:** Serologisch nachweisbare Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen rHämolysinen von *B. hyodysenteriae*

Antiseren	rHämolysine (Signalstärken im Immunoblot)				Negativkontrolle
	rHlyA-His	rTlyA-His	rTlyB-His	rTlyC-His	
CH 1242	+++	-	-	(+)	-
CH 1243	-	+++	-	(+)	-
CH 1244	-	-	+++	(+)	-
CH 1245	(+)	(+)	(+)	+++	-
CH 1247	-	-	-	-	-
CH 083	+) )	-	+	-	-

**Erläuterungen:** - = negativ, (+) = sehr schwache Reaktion, +++ = starke Reaktion, \*) = Reaktion mit der Zusatzbande auf ~ 22 kDa.





**Abbildung 15:** Reaktionen der anti-rHämolyin-Seren mit affinitätschromatografisch gereinigtem rTlyC-His im Immunoblot. Antigen = Impfantigen rTlyC-His.

1 = Ni-NTA-HRP-Konjugat, 2 = Anti-rHlyA-His (CH 1242), 3 = Anti-rTlyA-His (CH 1243), 4 = Anti-rTlyB-His (CH 1244), 5 = Anti-rTlyC-His (CH 1245), 6 = Negatives Kontrollserum (CH 1247), M = Marker. (PageRuler™ Prestained Protein Ladder), ◄ = rTlyC-HisProtein.

#### 4.4 Nachweis verschiedener Hämolysine bei unterschiedlichen *B. hyodysenteriae*-Serotypen unter Verwendung der rHämolysin-Antisera

Wie bereits in **Kapitel 4.1** dargestellt, konnten in allen *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämmen die Hämolysin-kodierenden Gene nachgewiesen werden. Mithilfe der rHämolysin-spezifischen Antisera wurde untersucht, ob auch die entsprechenden Proteine in den Ganzzelllysaten dieser Stämme nachgewiesen werden können. Zusätzlich wurde ein Ganzzelllysat des *B. innocens*-Stammes sowie ein Ganzzelllysat des leeren Vektors (Stamm BLR(DE3, pET-24b(+))) in die Untersuchung miteinbezogen. Um herauszufinden, ob die Proteine während des Wachstums sezerniert werden, wurden gefällte Proteine aus dem Überstand einer *B. hyodysenteriae*-Stamm B204-Kultur untersucht. Ebenfalls wurde im Immunoblot Verfahren der B204-HE-Extrakt auf das Vorkommen der rHämolysine getestet. Alle Ergebnisse zu dieser Fragestellung sind in **Tabelle 19** zusammengefasst. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse der PCR-Untersuchung auf das jeweilige Gen mit angegeben.

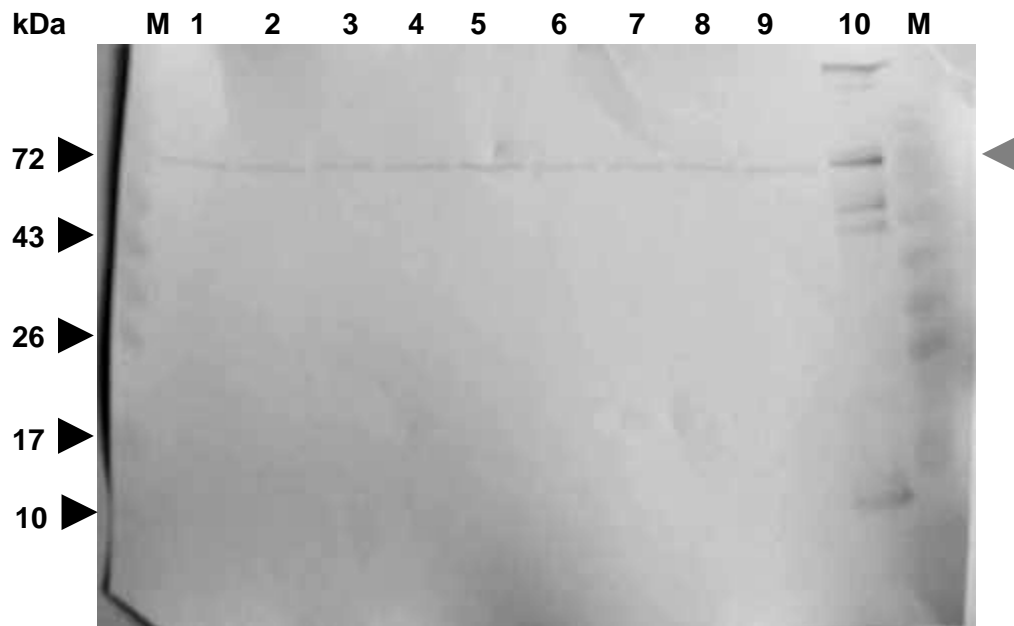
Bei den mit dem Immunoblot durchgeführten Untersuchungen waren nur die Proteine TlyB und TlyC in den Ganzzelllysaten der *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämmen

nachweisbar. Das Ganzzelllysate des leeren Vektors war erwartungsgemäß vollständig negativ. **Abbildung 16** zeigt beispielhaft das Ergebnis zur Detektion des Proteins TlyB in den *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämmen. Bei der Untersuchung des B204-HE-Extraktes wurden sowohl die rHämolysin spezifischen Antiseren, als auch ein im Kaninchen hergestelltes Antiserum gegen das Ganzzelllysate von B204 (CH 083) sowie ein Serumpool von Dysenterie rekonvaleszenten Schweinen (Antiserumpool) in einer Verdünnung von 1:50 [v/v] eingesetzt und miteinander verglichen. Mit dem Serum CH 083 wurden eine Vielzahl von Banden detektiert, wohingegen die rHämolysin-spezifischen Antiseren kein Protein in der erwarteten Größe der Hämolysine detektieren konnten. Der Antiserumpool lieferte nur schwache, verwaschene Banden verschiedener Größen (**Abbildung 17**).

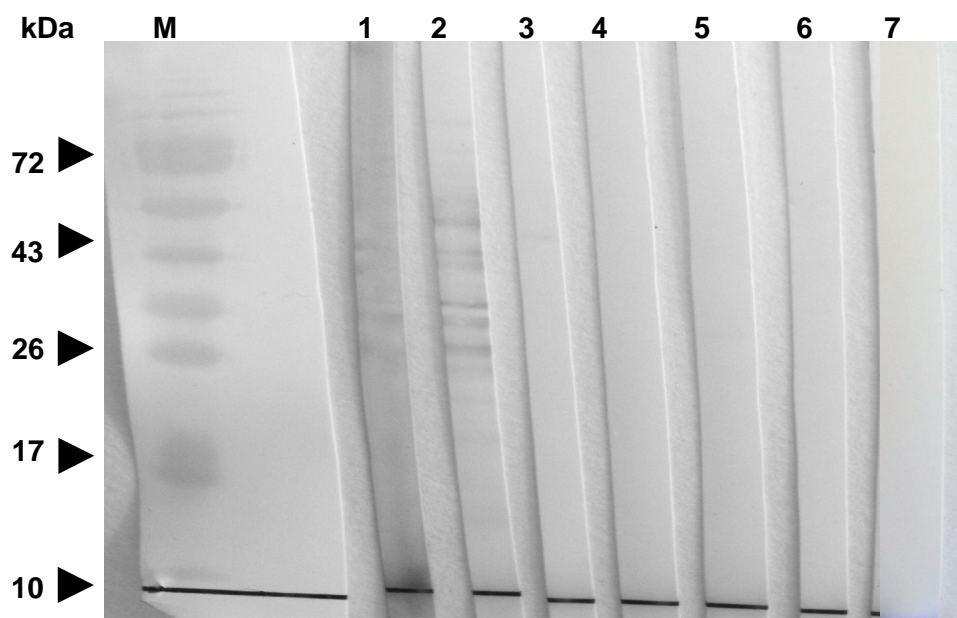
**Tabelle 19: Nachweis der Hämolysin-kodierenden Gene als auch der Hämolysine in verschiedenen Serotypen von *B. hyodysenteriae***

Getestete Stämme/ Präparationen		Nachweis mittels PCR bzw. Immunoblot							
		HlyA		TlyA		TlyB		TlyC	
		Gen <sup>1</sup>	Protein <sup>2</sup>	Gen <sup>1</sup>	Protein <sup>2</sup>	Gen <sup>1</sup>	Protein <sup>2</sup>	Gen <sup>1</sup>	Protein <sup>2</sup>
<i>B. hyodysenteriae</i> - Serotyp-Referenzstämme (GZL)	B78	+	-	+	-	+	+	+	+
	B204	+	-	+	-*	+	+	+	+
	B169	+	-	+	-	+	+	+	+
	A1	+	-	+	-	+	+	+	+
	B8044	+	-	+	-	+	+	+	+
	B6933	+	-	+	-	+	+	+	+
	Ack300/8	+	-	+	-	+	+	+	+
	Vic2	+	-	+	-	+	+	+	+
	NSW1	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>B. innocens</i> (GZL)		+	-	-	-*	-	+	-	+
BLR(DE3, pET-24b(+)) (GZL)		-	-	-	-	-	-	-	-
B204-HE-Extrakt		nt	-	nt	-	nt	-	nt	-
Gefällte Proteine aus B204-Kulturüberstand		nt	-	nt	-	nt	-	nt	-

**Erläuterungen:** - = keine Reaktion, + = positive Reaktion, nt = nicht getestet,  
1 = Nachweis mittels PCR, 2 = Nachweis im Immunoblot, \* = positiver Nachweis bei Antigenmengen von > 200 µg Gesamtprotein/Spur,  
**GZL** = Ganzzelllysate.



**Abbildung 16:** TlyB-Detektion in Ganzzelllysaten der *B. hyodysenteriae*-Serotyp-Referenzstämme durch das rTlyB-His spezifische Antiserum vom Kaninchen im Immunoblot.  
Einsatz des Antiserums 1:500 [v/v], Antigenauftrag (Spuren 1-9: 13,5 µg Gesamtprotein/Spur, 10: 2 µg Gesamtprotein/Spur); 1 = B78, 2 = B204, 3 = B169, 4 = A1, 5 = B8044, 6 = B6933, 7 = Ack300/8, 8 = Vic2, 9 = NSW1, 10 = rTlyB-His, M = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). ◀ = rTlyB-Protein,



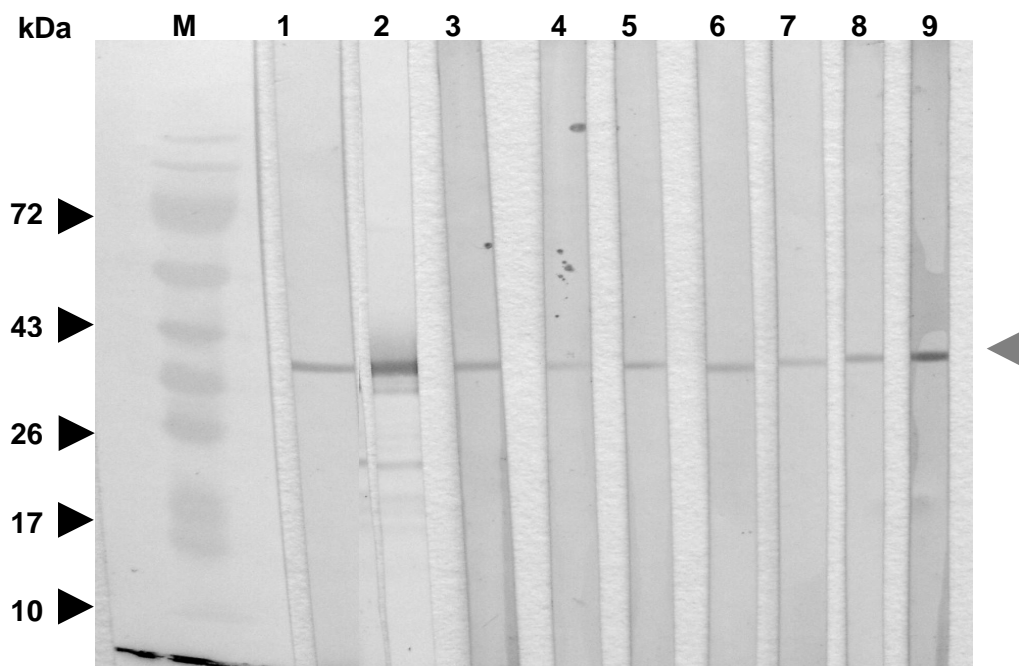
**Abbildung 17:** Ergebnis der Untersuchung des B204-HE-Extrakts mit rHämolysin-spezifischen Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot  
Antigenauftrag: 125 µg Gesamtprotein/Blot, 1-7 = Entwicklung mit verschiedenen Antiseren 1:50 [v/v], 1 = Antiserumpool, 2 = CH 083, 3 = CH 1242, 4 = CH 1243, 5 = CH 1244, 6 = CH 1245, 7 = CH 1247, M = Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).

## 4.5 Nachweis von Antikörpern gegen die verschiedenen rHämolysine von *B. hyodysenteriae* bei Schweinen

### 4.5.1 Seren rekonvaleszenter Schweine (Antiserumpool) und experimentell infizierter Ferkel

Alle untersuchten Serumproben (n=6) von Schweinen, die 30 Tage nach dreimaliger oraler Infektion mit *B. hyodysenteriae* entnommen wurden (**Tabelle 12**), und auch der Antiserumpool detektierten einheitlich jeweils eine Proteinbande in der gewünschten Größe des TlyA, TlyB und TlyC. Einzig bei der Verwendung von rHlyA-His als Antigen konnte nur durch das Serum CH 272 eine Proteinbande detektiert werden, die eine Größe von 22 kDa aufwies. Bei allen anderen Schweineseren und dem Antiserumpool konnten Banden in der erwarteten Größe des rHlyA-His oder mögliche Dimere von ca. 22 kDa nicht nachgewiesen werden.

**Abbildung 18** zeigt beispielhaft den Nachweis von Antikörpern gegen rTlyC-His in Schweineseren. Zwar wurden alle Seren als positiv beurteilt, jedoch fielen die Reaktionen deutlich schwächer aus als die homologen Reaktionen des rHämolysin-spezifischen Kaninchen-Antiserums (Spur 2).



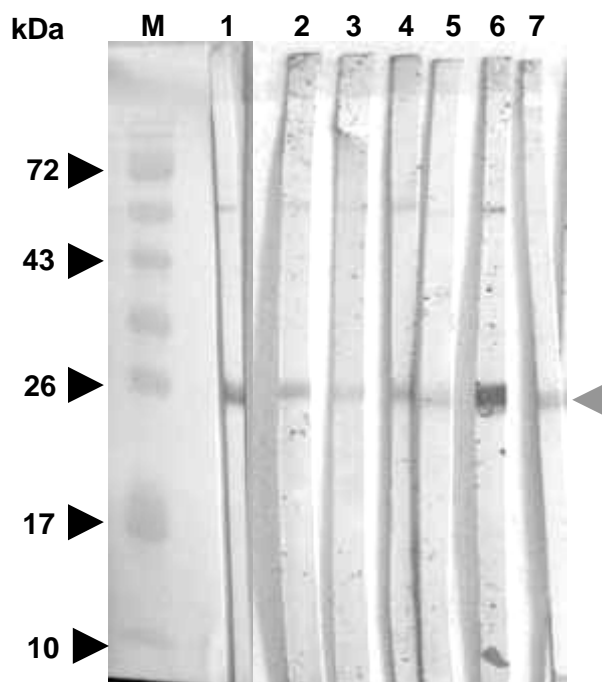
**Abbildung 18:** Antikörpernachweis gegen rTlyC-His in Seren infizierter Schweine im Immunoblot.

Einsatz der Antiseren 1:100 [v/v], Serum CH 1245 1:1.000 [v/v], Antigen = Impfantigen rTlyC-His.

**1** = Ni-NTA-HRP-Konjugat; **2** = Serum CH 1245 (Positivkontrolle), **3** = Antiserumpool; **4-9** = Seren experimentell infizierter Schweine 30 Tage nach Infektion mit *B. hyodysenteriae*; ◀=TlyC-Protein

#### 4.5.2 Antikörpernachweis gegen verschiedene rHämolysine in Seren von Schweinen vor und nach intragastraler experimenteller Infektion mit *B. hyodysenteriae*

Bei den im Rahmen der tierexperimentellen Studie mit *B. hyodysenteriae* an Schweinen gewonnenen Serumproben war im Immunoblot keine Serokonversion nach Infektion nachweisbar (**Tabelle 20**). Alle in der vorliegenden Studie untersuchten Serumproben (von insgesamt 6 Tieren aus 2 verschiedenen Infektionsversuchen, **Tabelle 12**) von den Tagen -26, -13, 0 (Zeitpunkt der Infektion), +14 und +30 zeigten im Immunoblot jeweils gleich starke Reaktionen. Auffällig waren hier nur zwei Ergebnisse: zum Einen die Reaktion gegen das rHlyA-His als Antigen welche nur bei dem Serum CH 272 (30 d.p.i.) auftrat und zum Anderen die Reaktion des Tieres 1560 gegen das rTlyA-His als Antigen. Hier konnte eine starke Reaktion des Serums CH 271 (30 d.p.i.) mit dem Antigen rTlyA-His durch Präadsorption dieses Serums mit dem *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 deutlich abgeschwächt werden (Spuren 6 und 7 in **Abbildung 19**). Reaktionen früherer Seren dieses Tieres waren nur schwach ausgeprägt. Alle Ergebnisse zur Untersuchung der Immunantwort im Schwein sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.



**Abbildung 19: Antikörper gegen TlyA-His in Seren von experimentell mit *B. hyodysenteriae*-infizierten Schweinen im Immunoblot.**

Einsatz der Antiseren 1:100 [v/v], Antigen = Impfantigen rTlyA-His.

1= Ni-NTA-HRP-Konjugat, 2 = CH 137, 3 = CH137 nach Präadsorption mit B204, 4 = CH 220, 5 = CH 220 nach Präadsorption mit B204, 6 = CH 271, 7 = CH 271 nach Präadsorption mit B204 ◀ = TlyA-Protein.

**Tabelle 20: Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene rHämolysine in Serumproben von Ferkeln zu verschiedenen Zeiten vor und nach experimenteller Infektion mit *B. hyodysenteriae***

Antikörper		Nachweis im Immunoblot gegen				
Serum	Tage vor bzw. nach exp. Infektion	rHlyA-His	rTlyA-His	rTlyB-His	rTlyC-His	Negativkontrolle
AS-Pool		-	+	+	+	-
CH 088	- 26	nt	+	+	+	nt
CH 137	➡ 0	nt	+	+	+	nt
CH 220	14	nt	+	+	+	nt
CH 271	30	-	+ #	+	+	-
CH 089	- 26	-	+	+	+	nt
CH 138	➡ 0	-	+	+	+	nt
CH 221	14	-	+	+	+	nt
CH 272	30	+*	+	+	+	-
CH 092	- 26	nt	+	+	+	nt
CH 141	➡ 0	nt	+	+	+	nt
CH 222	14	nt	+	+	+	nt
CH 265	24	nt	+	+	+	nt
CH 273	30	-	+	+	+	-
CH 528	- 13	nt	+	+	+	nt
CH 576 <sup>1</sup>	➡ 0	nt	+	+	+	nt
CH 662 <sup>1</sup>	14	nt	+	+	+	nt
CH 692 <sup>1</sup>	30	-	+	+	+	-
CH 530	- 13	nt	+	+	+	nt
CH 578	➡ 0	nt	+	+	+	nt
CH 664	14	nt	+	+	+	nt
CH 702	30	-	+	+	+	-
CH 534	- 13	nt	+	+	+	nt
CH 582	➡ 0	nt	+	+	+	nt
CH 666	14	nt	+	+	+	nt
CH 703	30	-	+	+	+	-

**Erläuterungen:** + = positive Reaktion; - = negative Reaktion; \* = Reaktion mit der HlyA-Doppelbande; # = schwächere Reaktion nach Präabsorbtion der Seren mit Ganzzelllysat von Stamm B204; **Negativkontrolle** = aufgereinigte Präparation des leeren Vektors (Stamm BLR(DE3, pET-24b(+))), <sup>1</sup> = Belastung mit BHI-Medium (Placebo), **nt** = nicht getestet.

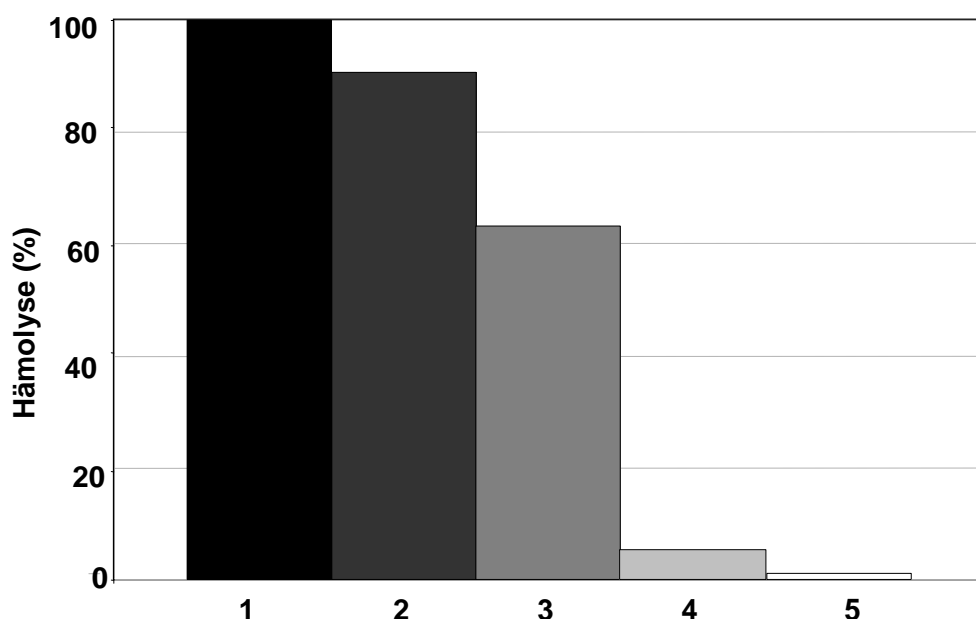
➡ Dreimalige, intragastrale Infektion mit *B. hyodysenteriae* bzw. mit BHI-Medium (CH 576)

#### 4.6 Hämolytische Aktivität der Transformanten und der gereinigten rHämolysine im Vergleich zu einem Hämolysinextrakt aus *B. hyodysenteriae*

##### 4.6.1 Prüfung der hämolytischen Aktivität des B204-HE-Extrakts (positive Kontrolle)

##### Herstellung und Lagerung der Extrakte

Die Herstellung eines hämolysierenden Extrakts des *B. hyodysenteriae*-Stamms B204 als Positivkontrolle für die Hämolysen-Assays erfolgte nach verschiedenen Protokollen (**Kapitel 3.4.5**). Dabei erwies sich nur der nach Protokoll b hergestellte Extrakt (mit HE-Puffer, ohne Ultraschall) als hämolysierend. Allerdings trat nach 24-stündiger Lagerung des Extrakts bei 4 °C ein vollständiger Verlust der hämolytischen Aktivität auf. Auch eine Inkubation des Extrakts für 30 min bei 37 °C führte zu einem vollständigen Verlust der Aktivität und sogar eine Lagerung für 30 min bei Raumtemperatur führte zu einer deutlich verminderten Aktivität dieser Präparation. In **Abbildung 20** sind die Ergebnisse zu diesen Vorversuchen graphisch dargestellt.



**Abbildung 20:** Temperatureinfluss auf die Aktivität eines hämolysierenden Extraktes von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204

**Erläuterungen:** 1 = Hämolysen des B204-HE-Extrakts ohne vorherigen Temperatureinfluss; 2 = HE-Extrakt nach 30 min Inkubation bei 4 °C; 3 = HE-Extrakt nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur; 4 = HE-Extrakt nach 30 min Inkubation bei 37 °C; 5 = Negativkontrolle (PBS-Puffer).

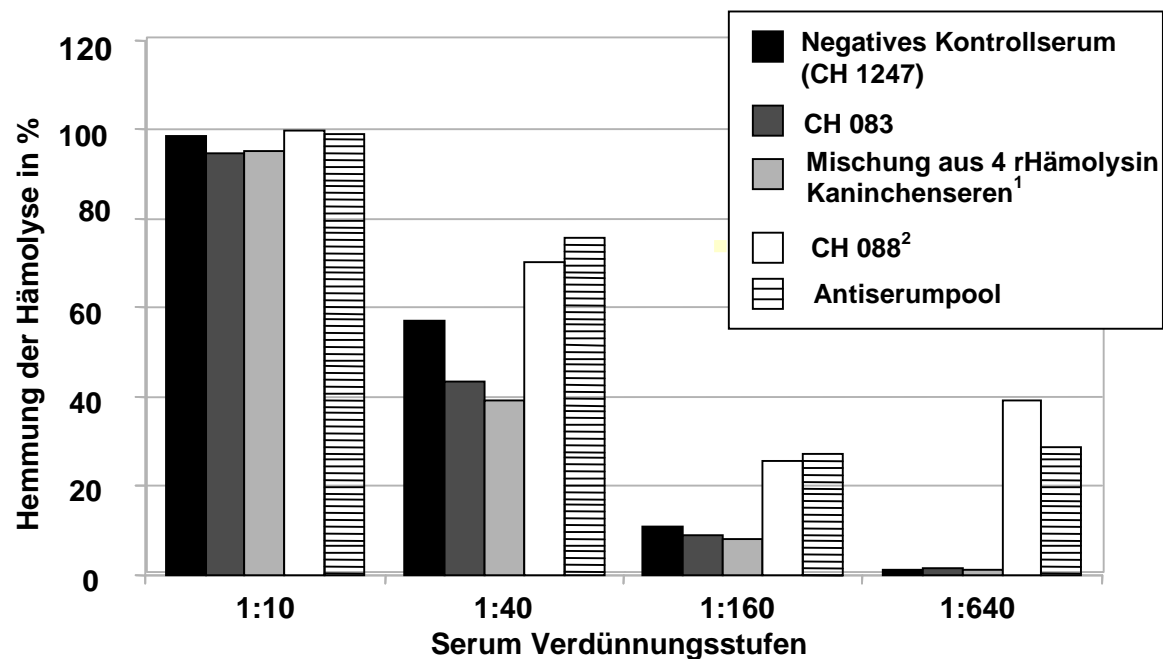
### **Hemmung der hämolytischen Aktivität des B204HE-Extrakts durch rHämolysin-spezifische Antiseren von Kaninchen**

In diesen Versuchen wurden die rHämolysin-spezifischen Antiseren einzeln und in Kombinationen, ein gegen das Ganzzelllysate von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 gerichtetes Kaninchenserum (CH 083), der Antiserumpool aus Feldseren rekonvaleszenten Schweine und ein Serum eines Schweines vor der experimentellen Infektion auf ihre mögliche Hämolysenhemmung hin untersucht.

Sowohl über 30 min und 4 h bei 4 °C, als auch für 10 und 30 min bei Raumtemperatur führten alle Seren, inklusive der negativen Kontrollseren bis zu einer Verdünnung von 1:40, zu einer deutlichen Reduktion der Hämolysen. In der Verdünnungsstufe 1:640 lag ein signifikanter Unterschied in der Hämolysenhemmung zwischen den Seren der Schweine und Kaninchen vor. Entsprechende Unterschiede waren bereits in den Verdünnungen 1:160 und 1:40 erkennbar. In allen Fällen war der Hemmeffekt der Schweineseren größer, als jener aller geprüften Kaninchenseren. Unterschiede zwischen negativem Kontrollserum und spezifischem Antiserum (Kaninchen), bzw. Rekonvaleszentenserum (Schwein), lagen jedoch nicht vor. In **Abbildung 21** sind die Ergebnisse des Hämolysenhemmtests nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur graphisch dargestellt.

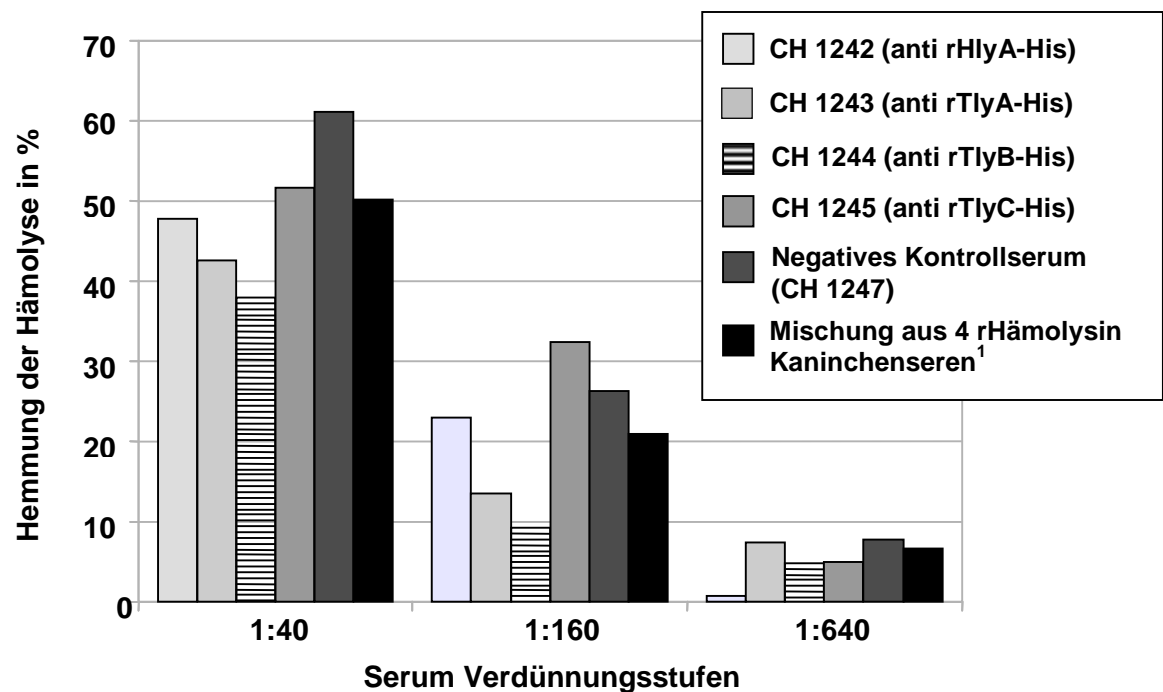
**Abbildung 22** präsentiert Ergebnisse des Hämolysenhemmtests nach 10 minütiger Inkubation der Ansätze bei Raumtemperatur, unter Verwendung aller rHämolysin-spezifischen Antiseren einzeln, im Vergleich zu einer Mischung aus allen vier Seren. Die Hämolysenhemmung ist in allen Ansätzen etwas höher als nach einer Inkubation der Ansätze für 30 min bei Raumtemperatur. Weiterhin fällt auf, dass das mitgeführte negative Kontrollserum (Kaninchenantiserum nach Immunisierung mit dem leeren Vektor) in der Verdünnung 1:40 die höchste Reduktionsrate aufweist und auch in den anderen Verdünnungsstufen teilweise zu einer stärkeren oder zumindest gleich hohen Reduktion führt wie die rHämolysin-spezifischen Antiseren. Bezogen auf die ausgewählten Kontrollserumproben war somit in keinem Fall eine spezifische Hemmung der Hämolysen nachweisbar.





**Abbildung 21:** Hämolysehemmttest unter Verwendung verschiedener Antiseren gegen die rHämolysine nach 30 minütiger Inkubation

**Erläuterungen:** 1 = Kaninchenserum CH 1242, CH 1243, CH 1244 und CH 1245;  
2 = Schweineserum vor experimenteller Infektion mit Brachyspiiren.



**Abbildung 22:** Reduktion der Hämolyse durch die rHämolysin-spezifischen Antiseren nach 10 minütiger Inkubation in ausgewählten Verdünnungsstufen im Vergleich

**Erläuterungen:** 1 = Kaninchenserum CH 1242, CH 1243, CH 1244 und CH 1245

#### 4.6.2 Hämolysinbildung der Transformanten bei Vermehrung auf verschiedenen, festen Nährmedien

Um die Transformanten auf potentiell hämolysierende Eigenschaften zu untersuchen, wurden diese auf Agarplatten mit verschiedenen Zusätzen angezüchtet. Von den auf verschiedenen, bluthaltigen, festen Nährböden vermehrten Transformanten mit dem jeweiligen Hämolysingen in jeweils korrekter Position und Sequenz, besaß keiner einen hämolytischen Phänotyp. Eine Ausnahme stellte das Wachstum der Transformanten auf Müller-Hinton (MH)-Agar dar. Hier zeigten alle Transformanten einen hämolytischen Phänotyp. Auch die negative Kontrolle (BLR(DE3, pET-24b(+))) zeigte hier Hämolyse. Die Ergebnisse nach 48 stündiger Inkubation der Platten sind in **Tabelle 21** zusammengefasst. Einige Transformanten (ADtlyC, AD962, AD1870, ADyplQ und ADfabF) zeigten nach Anzucht auf Blut-Agarplatten mit Schafblut ohne Selektionsmarker phänotypische Diversitäten (winzige weiße Kolonien auf und neben normal aussehenden *E. coli*-Kolonien). Nach Subkultivierung sowohl winziger, als auch normal aussehender Einzelkolonien konnte das gleiche, heterogene Wachstum beobachtet werden. Diese Transformanten zeigten auch eine starke Wachstumsinhibition durch IPTG.

**Tabelle 21:** Anzucht der Transformanten auf bluthaltigen Nährmedien mit verschiedenen Zusätzen zum Nachweis des Wachstums und der Hämolyse

Hämolyse-Nachweis																		
Kontrollstämme																		
Transformanten																		
Nährboden	ADhiA	ADhiA'	ADtiA	ADtiB	ADtiC	AD962	AD1870	ADyplQ	ADhiY	ADfabF	ADfabG	ADfabUM	BLR(DE3, pET-24b(+))	<i>E. coli</i> 3306/05	SA	ScE	RE	PP
Schaf-BAP	-	-	-	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Schaf-BAP <sup>Kl</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Schaf-BHI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
Schaf-BHI <sup>I</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
Schaf-MH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)
Pferd-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
Pferd-BAP <sup>I</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
Rind-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
Rind-BAP <sup>I</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
Rind-DST <sup>Kl</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	k. W.

**Erläuterungen:** + = Hämolyse makroskopisch erkennbar, - = keine Hämolyse, (+) = schwache Hämolyse, nt = nicht getestet, \* = phänotypische Diversitäten, k.W. = kein Wachstum, SA = *Staphylococcus aureus*, ScE = *Streptococcus equi*, RE = *Rhodococcus equi*, PP = *Psychrobacter phenylpyruvicus*, BAP = Blut-Agarplatten, MH = Müller-Hinton-Agar, DST = DST-Agar (Nährböden siehe Anhang ab Seite 100), <sup>I</sup> = Zusatz von 1 mM IPTG, <sup>KI</sup> = Zusatz von 30 µg/ml Kanamycin und 125 µM IPTG in den Agar-Platten.

#### 4.6.3 Untersuchung der Transformanten im CAMP-Test

Um zu überprüfen, ob die Transformanten in der Lage sind die unvollständige Hämolyse eines anderen Bakteriums zu verstärken, wurden alle Transformanten auf das Vorhandensein eines CAMP-Phänomens untersucht. (**Kapitel 3.2.2**)

Dabei kam es im Standardverfahren im überlappenden Bereich zu einer Verstärkung der Hämolysezone der Ammen durch die jeweiligen Kontrollstämme (**Tabelle 23**) Diese positive Reaktion trat jedoch bei keiner der Transformanten auf. Auf Blut-Agarplatten mit Pferdeblut kam es auch bei den Kontrollen zu keinem CAMP-Phänomen.

Auch bei den Kombinationsverfahren zeigte keiner der Transformanten als Testkeim im überlappenden Bereich der Amme und des Klons AD962 ein positives CAMP-Phänomen (**Tabelle 22**).

**Tabelle 22: CAMP-Phänome der Transformanten im Kombinationsverfahren nach aerober Inkubation bei 37 °C**

Testansatz (Ammen und Anzuchtmedium)	CAMP-Phänomen der Transformanten mit AD962 und								
	ADhlyA	ADhlyA <sup>-</sup>	ADtlyA	ADtlyB	ADtlyC	ADfabG	ADfabF	ADfabUM	BLR (DE3, pET24b)
<i>Staphylococcus aureus</i> auf Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus equi</i> auf Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> auf Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> auf Rind-DST <sup>KI</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** + = positives CAMP-Phänomen, - = kein CAMP-Phänomen, **BAP** = Blut-Agarplatten, **DST** = DST-Agar (Nährböden siehe **Anhang ab Seite 100**), <sup>KI</sup> = Zusatz von 30 µg/ml Kanamycin und 125 µM IPTG in den Agar-Platten.

Tabelle 23: CAMP-Phänomene der Transformanten im Standardverfahren nach aerober Inkubation bei 37 °C

CAMP-Phänomen des jeweiligen Transformanten bzw. Stammes																				
Testansatz (Amme und Anzuchtmedium)	ADh1A	ADh1A <sup>-</sup>	ADt1A	ADt1B	ADt1C	AD962	AD1870	ADyplQ	ADh1y	ADfabF	ADfabG	ADfabUM	BLR(DE3, pET24b)	<i>E. coli</i> 3306/05	SA	ScE	ScA	ScD	RE	PP
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)																				
Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	+	+	-	+	n.t.
Schaf-MH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	+	n.t.	n.t.	+	n.t.
Rind-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	-	n.t.	n.t.	+	+
Pferd -BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	-	n.t.	n.t.	-	-
<i>Streptococcus equi</i> (SE)																				
Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Schaf-MH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	n.t.	n.t.	n.t.	+	n.t.
Rind -BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	n.t.	n.t.	n.t.	+	+
Pferd -BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> (RE)																				
Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	+	-	n.t.	n.t.
Schaf-MH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Rind -BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	n.t.	n.t.	n.t.	-
Pferd -BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	-
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> (PP)																				
Schaf-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Schaf-MH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Rind -BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	n.t.	n.t.	+	n.t.
Pferd-BAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.t.	n.t.	-	n.t.

**Erläuterungen:** + = positives CAMP-Phänomen, - = kein CAMP-Phänomen, nt = nicht getestet,

SA = *Staphylococcus aureus*, ScE = *Streptococcus equi*, RE = *Rhodococcus equi*, PP = *Psychrobacter phenylpyruvicus*,  
ScA = *Streptococcus agalactiae*, ScD = *Streptococcus dysgalactiae*, BAP = Blut-Agarplatten, MH = Müller-Hinton-Agar  
(Nährböden siehe Anhang ab Seite 100).

#### 4.6.4 Hämolyse-Induktion der rHämolysine im Hämolyse-Assay

Zur genaueren und objektiv messbaren Untersuchung der Transformanten auf ihre hämolytischen Eigenschaften wurden nach Protokoll b) und c) hergestellte HE-Extrakte (**Kapitel 3.4.5**) und aufgereinigte, rekombinante Proteine im Hämolyse-Assay mit Schaferythrozyten untersucht (**Kapitel 3.6.2**). Da nur die Messung nach 24 h zu verlässlichen Messwerten führte, sind in **Tabelle 24** die Mittelwerte dieses Messzeitpunkts aufgeführt. Länger inkubierte Ansätze zeigten teilweise eine spontan auftretende Hämolyse, die auch bei den Negativkontrollen auftrat. Stabile Ansätze zeigten auch nach vier Tagen keine Hämolyse gegenüber der Negativkontrolle.

Die Präparationen des Stamms 3306/05 erwiesen sich nach beiden HE-Protokollen (Protokoll b) und c), siehe **Kapitel 3.4.5**) als hämolytisch. Bei der Untersuchung des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 ergab dagegen nur das nach Protokoll b) (ohne Ultraschallbehandlung) hergestellte Produkt eine Hämolyse. Bei der Untersuchung von entsprechend produzierten Extrakten aus den Hämolysingen-tragenden *E. coli*-Stämmen blieb dagegen in allen Fällen eine Hämolyse aus (**Tabelle 24**). Auch von den affinitätschromatographisch aufgereinigten Hämolysinen ging im Hämolyse-Assay keinerlei hämolytische Aktivität aus. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der zusätzlich generierten *hlyA*-Klone getrennt aufgeführt (**Tabelle 25**).

**Tabelle 24:** Hämolytische Aktivität der rHämolysine sowie verschiedener Extrakte der Transformanten mit Hämolysingen (Hämolyse-Assay)

Protein- Prä- paration	Prozent Hämolyse								3306/05	B204
	rHlyA- His	rTlyA- His	rTlyB- His	rTlyC- His	r962- His	Komb. 1	Komb. 2			
HE-Ex- trakte	-	-	-	-	-	-	-		92,0	60- 80 %*
HE-US- Extrakte	-	-	-	-	-	-	-		96,6	- -
rHäm- His	-	-	-	-	nt	-	nt		nt	nt

**Erläuterungen:** - = keine Hämolyse (< 5 %), **Komb. 1** = Mischung aus HlyA, TlyA, TlyC und TlyC, **Komb. 2** = Komb. 1 + 962, \* = der B204-HE-Extrakt wurde für alle Versuche auf eine Hämolyse von 60-80 % eingestellt, **nt** = nicht getestet.

**Tabelle 25: Hämolytische Aktivität verschiedener Extrakte der HlyA-Transformanten im Hämolyse-Assay**

Protein-Präparation	Prozent Hämolyse						
	ADHlyA <sup>-</sup>	ADfabG-His	ADfabF-His	ADfabUm	Komb. 3	3306/05	B204
HE-Extrakte	-	-	-	-	-	92,0	60-80 % *
HE-US-Extrakte	-	-	-	-	-	96,6	-

**Erläuterungen:** - = keine Hämolyse, **Komb. 3** = Mischung aus ADfabG, ADfabF und ADHlyA<sup>-</sup>, \* = der B204-HE-Extrakt wurde für alle Versuche auf eine Hämolyse von 60-80% eingestellt.

#### 4.6.5 Zytotoxizität der rHämolysine

Wie aus der **Tabelle 26** hervorgeht, war die Zytotoxizität der rHämolysine unter den beschriebenen Versuchsbedingungen für die in den Experimenten gewählten permanenten Zellkulturen extrem niedrig. Lediglich das rHlyA-His induzierte in allen drei Zellkulturen mäßige Zellveränderungen, die sich in einer Zellabrundung offenbarten. Was die CRFK-Zellen anbetrifft, waren entsprechende Zellveränderungen auch bei den anderen Hämolysinen, aber auch in der Negativkontrolle, vorhanden. Darüber hinaus induzierte das rTlyB-His geringfügige Zellabrundungen in IPEC-J2-Zellkulturen. Alle besprochenen Effekte traten erst spät nach Inokulation (20 h p. i.) und ausschließlich in sehr niedriger Verdünnung des rHämolysins auf. Eine Ausnahme bildete das auf MDCK-Zellen untersuchte rHlyA-His. Hier waren geringfügige Zellabrundungen zwar schon bereits 30 min p. i. nachweisbar, jedoch nicht mehr zu späteren Untersuchungszeitpunkten. In den Ansätzen des B204-HE-Extraktes (positive Kontrolle) traten bereits nach 30 min in der niedrigsten Verdünnung auf IPEC-J2-Zellen abgerundete Zellen auf. Nach längerer Inkubation verstärkte sich dieser Effekt. Bei höherer Verdünnung des B204-HE-Extrakts trat der Effekt nicht mehr so stark auf. In den anderen Zellkulturen kam es zu keinem Effekt durch den B204-HE-Extrakt.

**Tabelle 26: Zytotoxizität der rHämolysine für verschiedene permanente Säugetierzellkulturen**

Protein	Verdün- nung	Zytotoxizität zu verschiedenen Zeiten nach Inokulation								
		CRFK-Zellen			MDCK-Zellen			IPEC-J2-Zellen		
		30 min	120 min	20 h	30 min	120 min	20 h	30 min	120 min	20 h
<b>rHlyA-His</b>	1:2	-	-	+	+	-	-	-	-	+
	1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>rTlyA-His</b>	1:2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>rTlyB-His</b>	1:2	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>rTlyC-His</b>	1:2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B204-HE-Extrakt</b>	1:2	-	-	-	-	-	-	+	+	++
	1:4	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Negativkontrolle</b>	1:2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** - = keine zytotoxischen Effekte + = 10 % abgerundete Zellen, ++ = 20 % abgerundete Zellen, **Negativkontrolle** = Präparation des leeren Vektors BLR(DE3, pET24-b(+))



## 5 DISKUSSION

Die Hämolysine von *B. hyodysenteriae* spielen neben anderen Faktoren eine bedeutende Rolle im Rahmen der Pathogenese der Dysenterie. Beispielsweise verlor der Erreger mit der Deletion des Hämolysins TlyA seine Pathogenität für Schweine (ter Huurne et al., 1992). Trotz ihrer Bedeutung ist der Stand der Forschung bezüglich der Hämolysine jedoch als unbefriedigend zu bezeichnen. Vor Allem fehlt es an konkreten Ergebnissen über ihre biologischen und antigenen Eigenschaften, denn oft dienten zu Studienzwecken undefinierte hämolysierende Extrakte von *B. hyodysenteriae* (Lysons et al., 1991). Eine genauere Charakterisierung der mutmaßlichen Hämolysine ist daher notwendig und kann zum Verständnis der Pathogenese der Dysenterie beitragen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinant hergestellten Hämolysine (HlyA, TlyA-C) waren antigen wirksam und reagierten mit Seren experimentell infizierter Ferkel. Sie erwiesen sich jedoch weder einzeln, noch in Mischungen miteinander als hämolytisch. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der bisherigen wissenschaftlichen Auffassung über die Bedeutung dieser Proteine und wird daher, neben einer Verteidigung der Ergebnisse, besonders auch aus methodischer Sicht diskutiert.

### Klonierung und Expression der Hämolysine

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals alle, derzeit als Hämolysine beschriebenen Proteine erfolgreich in einen *E. coli* B-Stamm kloniert. In bisherigen Experimenten wurden bei der Klonierung immer auch benachbarte Sequenzen mitkloniert (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). Diesem Prozedere wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gefolgt, da hierdurch keine präzisen Aussagen über das fragliche Genprodukt erlangt werden können. Es ist somit wichtig, darauf hinzuweisen, dass definitiv nur der, das jeweilige Hämolysin kodierende, Leserahmen kloniert wurde. Nach der Klonierung ließen sich fünf der acht Proteine mit IPTG in verschiedenen Konzentrationen erfolgreich induzieren. Vier der fünf Proteine konnten erfolgreich Aufgereinigt werden. Somit standen erstmalig die Proteine HlyA und TlyA-C als Fusionsproteine für Untersuchungen zur Verfügung. Die Klonierung und Expression der Proteine rHlyA-His, r962-His, r1870-His, rYplQ-His und rHly-His verlief jedoch nicht problemlos.

Drei der acht Klone (**AD1870, ADhly und ADyplQ**) reagierten nach Induktion mit IPTG mit einer erheblichen Reduktion ihres Wachstums. Dies könnte ein Hinweis für eine hohe Toxizität dieser Proteine für den Wirt sein (Grossman et al., 1998). Aus diesem Grund wurden verschiedene Protokolle angewendet (**Tabelle 15**), um potentiell toxische Effekte abzumildern. Niedrige IPTG-Konzentrationen führten zwar nicht mehr zu einer

Wachstumsdepression, es wurde aber auch kein Protein exprimiert. Somit konnte die auf der Toxizität der Proteine bestehende Theorie nicht abschließend geklärt werden.

Eine andere Ursache für die fehlgeschlagene Expression dieser Proteine könnten Unterschiede in der Codon-Usage von *Brachyspiren* und *E. coli* sein (Kane, 1995). Nach Sequenzanalyse der exprimierbaren und nicht-exprimierbaren Proteine ergab sich jedoch hierfür kein konkreter Beleg. Zwar traten die für *E. coli* seltenen Codone ATA, AAT ATA und TCT in den Gensequenzen für die nicht-exprimierbaren Proteine Hly, BHWA1\_1870 und YplQ auf, jedoch nicht häufiger als in den Gensequenzen für die exprimierbaren Proteine TlyA, TlyB, TlyC, HlyA und BHWA1\_962. Diese Tatsache spricht nach Kane nicht dafür, dass die Expression durch die Codon Usage reduziert sein sollte (Kane, 1995).

Bei Induktionsansätzen des Stamms **ADhly** traten drei Banden in einer Größe von 17 bis 26 kDa auf. Dies könnte unter Umständen auf einen bereits erfolgten Proteinabbau zurückzuführen sein. Um diesen Vorgang zu unterbinden oder zumindest zu reduzieren, wurde der Stamm ADhly bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 2,0 vermehrt und im Anschluss für 30, 60 und 120 min mit 250 und 1.000 µM IPTG induziert (**Tabelle 15**). Auch in diesen Ansätzen konnte kein Protein in der gewünschten Größe nachgewiesen werden. Somit erscheint ein zu schneller Abbau des Proteins als Ursache unwahrscheinlich. Vielmehr ist auch hier davon auszugehen, dass keine Bildung des Proteins stattgefunden hat. Als Ausweg könnten die Proteine in andere Vektoren und/oder andere Empfängerstämme umklontiert werden (Saida et al., 2006).

Auch was die Affinitätschromatographische Reinigung der Proteine anbetraf wichen die Ergebnisse z. T. erheblich von der Erwartung ab. So war z. B. die Reinigung des Proteins **r962-His** an einer Ni-NTA Matrix trotz Anwendung verschiedenster vom Hersteller empfohlener Protokolle nicht erfolgreich. Möglicherweise erfolgte keine Bindung des His-Tags an die Ni-NTA-Matrix. Ein Hinweis darauf waren die Verluste des Proteins bereits mit der Durchflussfraktion beim Auftrag auf die Ni-NTA-Matrix (**Abbildung 11**). Dieses Ergebnis könnte z.B. daraus resultieren, dass sich das His-Tag nicht nach Außen präsentierte, sondern innerhalb des Proteins lag. Als weitere Ursache kämen störende Einflüsse der Puffer in Frage. Diese Annahme erscheint jedoch unwahrscheinlich, da alle Puffer immer frisch hergestellt und die entsprechenden pH-Werte genau eingestellt wurden (The QIAexpressionist, 5<sup>th</sup> Edition).

Auf Grund der erheblichen Schwierigkeiten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Versuche zur Expression der lediglich als mutmaßlich in Frage kommenden Hämolsine nicht weitergeführt. Alle weiteren Untersuchungen konzentrierten sich daher auf die nach dem Schrifttum tatsächlich als Hämolsine ausgewiesenen Proteine HlyA und TlyA-C.

Von diesen Proteinen war beim Nachweis des **rHlyA-His**, unter Verwendung des His-Tag-Konjugats statt der erwarteten Bande von 11 kDa nur eine Bande im Bereich von 22 kDa detektierbar. Da diese Bande nur bei dem Klon ADhlyA auftrat, induzierbar und offensichtlich im Besitz eines His-Tags war, könnte es sich um ein Dimer des Proteins handeln. Hierzu passen auch Berichte aus der Literatur, nach welchen das HlyA ebenfalls eine Größe von ~ 20 kDa aufwies (Hsu et al., 2001). Die Autoren führten diesen Befund auf eine Linearisierung des Proteins zurück. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch im Westernblot sowohl Banden in Größen von 11 kDa, als auch 22 kDa nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht eher für das Vorliegen eines Dimers als einer Linearisierung (**Abbildung 10**).

Die gereinigten Proteinpräparationen wiesen trotz identischer Präparationstechniken sehr unterschiedliche Proteingehalte auf. Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedlichen Molekulargewichte der Proteine zurückgeführt werden. Die vorliegenden Ergebnisse, wie auch die Studien zur Expression verschiedener OMPs von *B. hyodysenteriae* (Richter, 2009) belegen, dass höhere Proteingehalte bei der Klonierung und Expression kleinerer Proteine vorkommen können.

### **Prüfung der Antigenität der Hämolsine**

Mit dieser Aufgabenstellung verbanden sich zwei Ziele. Zunächst war durch Immunisierungsversuche an Kaninchen zu klären, ob die Hämolsine in der Lage sind, im Tier Antikörper zu induzieren. Im positiven Falle sollten auch nach natürlicher Infektion mit *B. hyodysenteriae* Antikörper gegen diese Proteine nachweisbar sein, sofern diese von den Bakterien während einer Infektion überhaupt exprimiert werden. Der letzte Punkt sollte durch den Einsatz von Seren experimentell und natürlich infizierter Schweine (siehe **Tabelle 12** auf **Seite 42**) beantwortet werden.

Die Hämolsine erwiesen sich im Kaninchen als gute Antigene. Somit standen erstmalig definierte Antiseren gegen die von *B. hyodysenteriae* gebildeten Hämolsine zur Verfügung. Nachteilig war lediglich, dass einige Seren offensichtlich auch Antikörper gegen *E. coli*-Proteine aufwiesen, die bei der affinitätschromatographischen Reinigung der Zielproteine nicht eliminiert wurden (Serum gegen rTlyB-His und r962-His). Da diese Reaktionen nach Absorption der Seren mit dem Empfängerstamm nicht mehr auftraten, konnte mit Sicherheit angenommen werden, dass es sich hier tatsächlich um Antikörper gegen *E. coli*-Proteine handelte.

### **Nachweis der Expression der Hämolsine in verschiedenen *Brachyspira*-Serotyp-Referenzstämmen**

In früheren Untersuchungen mit Kaninchenantisera gegen rekombinant hergestellte äußere Membranproteine von Brachyspiren, konnten erfolgreich die entsprechenden Proteine in den

Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae*-Stämmen detektiert werden (Richter, 2009). Auch wurden bereits andere Histidin-markierte Proteine in Ganzzelllysaten von Brachyspiren nachgewiesen (La et al., 2005). Somit war es äußerst unwahrscheinlich, dass die Antiseren die fraglichen Proteine, sofern sie bei den verschiedenen *Brachyspira*-Serotyp-Referenzstämmen vorkommen, nicht erkennen sollten.

Unerwarteterweise konnte in den Serotyp-Referenzstämmen unter den gewählten Bedingungen (Vermehrung der Brachyspiren in BHIF+, anaerob bei 37 °C auf dem Schüttler) mit den im Kaninchen gewonnenen Antiseren lediglich **TlyB** und **TlyC** detektiert werden. Gemessen an der geringen Stärke der entsprechenden Banden im Immunoblot scheint die Expression dieser Proteine zudem sehr niedrig zu sein. TlyA und HlyA ließen sich dagegen in den Referenzstämmen überhaupt nicht nachweisen. Sehr wahrscheinlich wurden diese Proteine in noch geringeren Mengen als TlyB und TlyC gebildet und blieben somit unterhalb der Nachweisgrenze. Ein Hinweis hierfür ist die Tatsache, dass es bei einem Schweineserum (CH 271, siehe **Tabelle 20**) gelang, durch Präadsorption mit großen Mengen von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 Ganzzelllysat ( $2 \times 10^{10}$  WbE<sub>50</sub>/ml) die Reaktion gegen das rTlyA-His-Protein abzuschwächen. Dieses Ergebnis wurde mehrfach bestätigt. Im umgekehrten Experiment war nun, bei Verwendung hoher Proteinmengen des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 (bis zu 400 µg Gesamtprotein), im Immunoblot eine zarte Bande in der Größe des **TlyA** mit dem gegen dieses Protein gerichteten Antiserum vom Kaninchen nachweisbar. Dieser Versuch lässt vermuten, dass das TlyA unter den hier verwendeten Vermehrungsbedingungen vom Stamm B204 möglicherweise nur in äußerst geringen Mengen exprimiert wird. Eine entsprechend niedrige Expressionsrate dürfte auch bei den anderen Referenzstämmen vorliegen. Weitere Belege für eine tatsächlich sehr geringe TlyA-Expression stützen sich auf Experimente mit einem Kaninchenantiserum gegen das Ganzzelllysat von *B. hyodysenteriae* Stamm B204. Dieses Serum detektierte ebenfalls kein rTlyA-His. Als Erklärung könnte dienen, dass bei der Immunisierung des entsprechenden Kaninchens ausschließlich nur Antikörper gegen diskontinuierliche Epitope induziert worden sind, die das denaturierte rTlyA-His Protein nicht erkennen. Dies erscheint jedoch wenig überzeugend, da auch native Proteine lineare Epitope präsentieren (Murphy et al., 2009).

Grundsätzlich werden bei einer Immunisierung immer Antikörper gegen lineare (kontinuierliche) und gegen konformationsabhängige (diskontinuierliche) Epitope gebildet. Während diskontinuierliche Epitope bei einer Denaturierung des Antigens verloren gehen, bleiben lineare Epitope weiterhin erkennbar (Murphy et al., 2009). Auch wenn zur Aufreinigung der Proteine das Protokoll zur Gewinnung nativer Proteine angewendet wurde, ist es durchaus möglich, dass die rekombinanten Proteine überwiegend oder sogar ausschließlich in linearisierter Form vorlagen. Der Nachweis der nativen Proteine sollte dennoch möglich sein, da bei dem

verwendeten Immunoblot eine Denaturierung der Proteine durch die Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte, die auch die linearen Epitope zugänglich macht.

Das **HlyA** Protein wurde dagegen in keinem der *B. hyodysenteriae*-Stämme detektiert. Auch beim Einsatz großer Mengen der Bakterien konnte das Protein nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise reagierte aber das gegen das Ganzzelllysat von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 gerichtete Antiserum CH 083 bei Untersuchung von rHlyA-His-Präparationen mit einem 22 kDa Protein. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um das oben angesprochene Dimer des HlyA. Falls dies zutrifft, muss HlyA somit von *B. hyodysenteriae* exprimiert worden sein, wenn vermutlich auch nur in verschwindend geringen Mengen.

Insgesamt legen die Ergebnisse zu diesem Untersuchungsabschnitt die Vermutung nahe, dass die Hämolsine während der Vermehrung entweder sehr schnell ausgeschleust werden oder „gar nicht“ (TlyA), bzw. nur in geringen Mengen (TlyB und TlyC) exprimiert werden. Da in ersten Versuchen auch im Überstand eines *B. hyodysenteriae*-Stamms keines der Proteine nachgewiesen werden konnte, aber zu erwarten ist, dass Toxine ausgeschleust werden, muss man von einer mangelhaften Expression der Hämolsine bei Vermehrung in Bouillon ausgehen. Demnach könnte die Hämolsinexpression von den Milieubedingungen bei der Vermehrung der Bakterien geprägt sein. Zur Abklärung dieser Hypothese werden weitere Studien, unter Verwendung von Brachyspiren nach Vermehrung unter diversen Bedingungen (feste bzw. flüssige Nährmedien, verschiedene Temperaturen, größere Mengen des Überstands etc.), als empfehlenswert erachtet.

### **Charakterisierung des hämolysierenden B204-HE-Extraktes**

Im weiteren Verlauf der Suche nach der Natur der von *B. hyodysenteriae* auf bluthaltigen Nährböden ausgelösten, vollständigen Hämolyse interessierte die Frage, ob die fraglichen Hämolsine in einem von *B. hyodysenteriae* hergestellten hämolysierenden Extrakt (B204-HE-Extrakt) nachweisbar waren. Selbst bei Verwendung niedriger Verdünnungen (1:50) der gegen die rekombinanten Hämolsine gerichteten Antiseren waren im Immunoblot keine entsprechenden Banden in dem B204-HE-Extrakt nachweisbar. Entweder waren die Konzentrationen aufgrund mangelnder Expressionsraten der Proteine TlyA-C und HlyA zu gering, oder die Hämolsine waren bereits degradiert, oder aber HlyA und TlyA-C sind nicht die eigentlichen Hämolsine und folglich im hämolysierenden Extrakt auch nicht vorhanden und nachweisbar. Der letzte Punkt könnte ebenfalls erklären, warum keines der Hämolsin-Antiseren oder deren Gemisch in der Lage war, die Hämolyse zu hemmen. Es ist hierbei jedoch nicht auszuschließen, dass mögliche Teritär- oder Quartärstrukturen der Hämolsine, die aller Wahrscheinlichkeit nach von den Antiseren nicht erkannt werden, an diesem Ergebnis ursächlich mit beteiligt sind.

In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass auch das Antiserum CH 083 gegen das Ganzzelllysate von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 die Hämolyse nicht hemmte, obwohl das Serum in dem hämolysierenden Extrakt eine Reihe von Banden detektierte. Es ist daher zu vermuten, dass die Immunisierung des Kaninchens zwar zur Induktion von Hämolysinantikörpern führte, denen offenbar aber jegliche biologische Aktivität (Hämolysinhemmung) fehlte. Die Ursachen hierfür bleiben weitgehend unklar. Sehr wahrscheinlich kann aber die äußerst geringe Hämolysinproduktion der Bakterien für diesen Befund mitverantwortlich gemacht werden. Daher interessierte die Frage, ob nicht vielleicht erst nach einer Infektion mit *B. hyodysenteriae* im eigentlichen Wirt, dem Schwein, entsprechende Antikörper gebildet werden.

### **Hämolysin-Antikörper in experimentell mit *B. hyodysenteriae* infizierten Ferkeln**

Enttäuschenderweise waren im dem Serumpool von Schweinen nach einer überstandenen Dysenterie keine, die Hämolyse des B204-HE-Extrakts hemmenden, Eigenschaften vorhanden. Auch alle untersuchten Seren von experimentell infizierten Ferkel blieben in den Hämolysehemmversuchen negativ. Somit werden im Verlaufe einer Infektion mit *B. hyodysenteriae* (exakt bis 30 Tage nach der Infektion) keine Antikörper gebildet, die die biologische Funktion der Hämolysine beeinflussen. Dieses Ergebnis war völlig unerwartet, da die Hämolysine bisher als bedeutende Pathogenitätsfaktoren angesehen wurden und eine Ausschaltung/Hemmung im Interesse des Wirts liegen sollte. Möglicherweise liegen aber den Ergebnissen methodische Unzulänglichkeiten zugrunde. So konnte die Inkubation der Seren mit dem B204-HE-Extrakt aufgrund der Temperaturinstabilität des Extraktes (s.u.) nur für 30 min bei Raumtemperatur vorgenommen werden. Häufig werden in solchen Versuchen jedoch Inkubationszeiten von 1 h bei 37 °C angewendet. Sehr groß dürfte der Einfluss der Inkubationszeit nach hausintern mitgeteilten Erfahrungen mit vergleichbaren Testsystemen (z. B. Neutralisationstest) jedoch nicht sein. Zum Beispiel war auch im Immunoblot für eine Bindung der Antikörper eine Inkubationszeit der Blots von 30 min vollkommen ausreichend.

In Anbetracht des negativen Hämolysehemmtests trat die Frage auf, ob im Schwein während einer Infektion überhaupt Antikörper gegen die Hämolysine gebildet werden. Dies kann man nach den Untersuchungsergebnissen im Immunoblotverfahren zumindest für die Hämolysine **TlyA-C** mit „ja“ beantworten,.

Überraschenderweise hatten die infizierten Tiere aber bereits vor (Tage -26 und -13) und zum Zeitpunkt der Infektion (Tag 0) Antikörper gegen die rTlyA-C-His-Proteine. Es ist schwer nachzuvollziehen, warum die Tiere bereits vor der Infektion TlyA-C spezifische Antikörper aufwiesen. Als eine naheliegende Ursache für diese unerwarteten serologischen Reaktionen der Ferkel kommen Infektionen mit schwach hämolysierenden Brachyspiren in Frage, die möglicherweise über entsprechende kreuzreagierende Proteine verfügen. Diese Erreger

wurden gelegentlich bei den Versuchstieren nachgewiesen und einige besitzen nach eigenen Untersuchungen das TlyB- und TlyC-Protein. Auch das TlyA-Protein konnte nachgewiesen werden. Kreuzreaktionen mit Proteindomänen anderer Bakterien sind ebenfalls zu diskutieren. So verfügt das TlyA-Protein über eine S4 Domäne und eine Methyltransferase, die zur Familie der S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen gehört. S4 Domänen sind konservierte Domänen, welche vermutlich eine RNS bindende Funktion besitzen und in verschiedenen Strukturen, z. B. Stressproteinen, ribosomalen Proteinen und tRNS-Synthetasen vorkommen. Methyltransferasen sind Enzyme, die nach ihrer Substratspezifität klassifiziert werden können. S4 Domänen und Methyltransferasen kommen auch in verschiedenen Clostridien, z.B. *C. saccharolyticum* (Lucas et al., 2010), sowie Eubakterien und *Geobacillus* sp. (Lucas et al., 2009) vor. Das TlyB besitzt zudem eine ClpB-Domäne und TlyC verfügt über eine CBS-Domäne. Diese Proteine (siehe **Kapitel 2.3.1**) kommen ebenfalls in verschiedenen anderen Bakterien vor.

Innerhalb der oben beschriebenen Domänen sind in den linearen Proteinstrukturen teilweise hohe Übereinstimmungen vorhanden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bereits 5 bis 6 Aminosäuren ein Epitop darstellen und daher bereits kurze Übereinstimmungen von weniger als 15 Aminosäuren zur Ausbildung einer Kreuzreaktion führen können, könnte dies die frühe Reaktion der Schweine erklären (Borchert, 2004; Berglund et al., 2008). Des Weiteren können auch Antikörper, die gegen diskontinuierliche Epitope gerichtet sind, die Domänen erkennen, ohne dass die lineare Struktur exakt übereinstimmt.

Vollkommen unerklärlich bleibt aber, warum es nach der Infektion nicht zu einer Intensivierung der Bandenstärken (Serokonversion) im Immunoblot kam. Mit Ausnahme eines Ferkelserums, bei dem eine Präabsorption des Serums mit dem *B. hyodysenteriae* Stamm B204 zu einer erheblichen Minderung der Bandenstärke des rTlyA-His im Immunoblot führte, konnte keine Serokonversion nachgewiesen werden. Entweder bilden die Schweine innerhalb von 30 d.p.i. keine Antikörper gegen die Hämolsine, hier könnte die Untersuchung einer größeren Stichprobe über einen längeren Infektionszeitraum hilfreich sein um eine verlässliche Aussage über mögliche immunmodulatorischen Effekte der Proteine treffen zu können, oder diese Proteine werden von den Spirochaeten nicht gebildet (was aufgrund der Bedeutung der Proteine im Verlauf einer natürlichen Infektion als wenig wahrscheinlich angesehen werden kann), oder aber sie werden von den Makrophagen nicht oder erst sehr spät präsentiert. Letzteres erscheint auf Grund der möglichen Zytotoxizität der Hämolsine als die wahrscheinlichste Ursache. Nicht auszuschließen ist auch, dass die Hämolsine kurz nach Freisetzung degradiert bzw. proteolytisch abgebaut wurden und auch aus diesem Grund als Antigen nicht oder nur unzureichend wirksam werden können.

Gegen das **rHlyA-His** hatte dagegen nur eins der infizierten Schweine Antikörper, jedoch lediglich zum Zeitpunkt 30 d.p.i. und auch nur gegen das HlyA-Dimer. Es ist schwer nachvoll-

ziehbar, warum diese Reaktion nur bei einem von sechs untersuchten Ferkeln nachweisbar war. Alle anderen untersuchten Ferkel hatten das gleiche Alter und wurden mit dem gleichen Brachyspiren Stamm infiziert. Möglicherweise werden gegenüber dem HlyA nur sehr geringe Antikörpertiter gebildet oder diese erreichen erst viel später als 30 d.p.i. ihr Maximum. Auch in diesem Fall sind Kreuzreaktionen mit Proteinen anderer Bakterienspezies als Ursache der Reaktionen nicht auszuschließen. So kommen in verschiedenen Bakterien, wie z.B. *Helicobacter suis* (Vermoote et al., 2011) und *Leptotrichia buccalis* (Ivanova et al., 2009) „Acyl-Carrier“-Proteine (ACP) vor, welche dem HlyA-Protein (das ebenfalls ein ACP ist) sehr ähnlich sind.

### **Untersuchungen zur biologischen Aktivität**

Die Erforschung der biologischen Aktivität erfolgte anhand des Wachstumsverhaltens der Transformanten auf Blutplatten und durch die Untersuchung von löslichen Bakterienzell-extrakten und den isolierten, rekombinanten Hämolsinen in einem Hämolysetest.

Keines der rekombinant hergestellten und anschließend gereinigten Hämolsine wies eine hämolytische oder zytotoxische Aktivität auf. Da nicht auszuschließen war, dass mit der Reinigung der Proteine u. U. ein erheblicher Verlust an biologischer Aktivität einherging, wurden auch die Transformanten in die Untersuchung miteinbezogen. Durch ein erheblich gestrafftes Reinigungsprotokoll (2 Zentrifugationsschritte, 1 Resuspensionsschritt, 1 Ultraschallbehandlung) sollte verhindert werden, dass die Hämolsine während der Prozedur Schaden nehmen. Hierdurch entstanden die sogenannten HE-Extrakte. Die in der Literatur beschriebenen „Osmotic-Shock“-Proteine waren für die Untersuchung nicht geeignet. Bei diesem Verfahren werden überwiegend periplasmatische Proteine freigesetzt (Heppel, 1967). Aufgrund des Fehlens von Signalsequenzen war es aber eher unwahrscheinlich, dass die von *E. coli* hergestellten Hämolsine in den periplasmatischen Raum geschleust wurden. Nach orientierenden Versuchen bestätigte sich die Unbrauchbarkeit dieser Technik. Es erscheint daher sehr verwunderlich warum dieses Verfahren bei anderen Untersuchern (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001) anscheinend erfolgreich war.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Technik zur Extraktion von Hämolsinen war, wie die Ergebnisse mit einem Extrakt aus einem hämolysierenden *E. coli* zeigen, gut geeignet. Dennoch induzierte keiner der generierten Transformanten beim Wachstum auf bluthaltigen Nährböden eine Hämolyse, noch waren die aus ihnen hergestellten Extrakte hämolytisch.

Ein zur Kontrolle aus dem *B. hyodysenteriae*-Stamm hergestellter HE-Extrakt (hergestellt ohne Ultraschallbehandlung) besaß dagegen hämolytische Aktivität. Es ist bekannt, dass die hämolytische Aktivität von *B. hyodysenteriae* durch äußere Einflüsse sehr schnell gemindert werden kann (Knoop, 1981). Daher wird bei der Extraktion des Hämolsins aus *B. hyodysenteriae* stets ein sogenanntes „RNA-Core“ zur Stabilisierung des Proteins

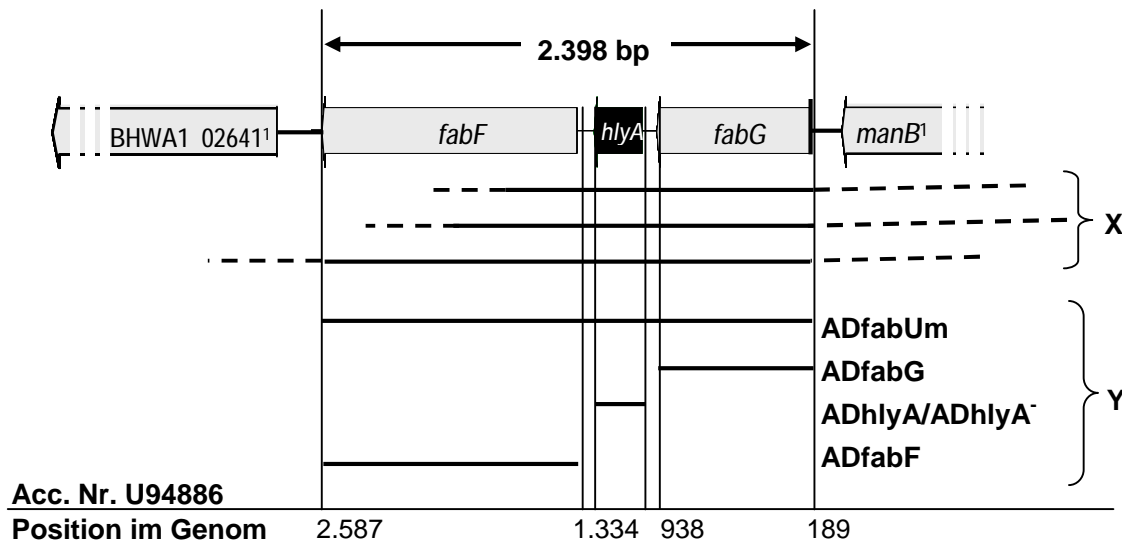


hinzugefügt. Eine vergleichbare Substanz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Das Fehlen jeglicher hämolytischer Aktivität der Extrakte aus den Transformanten, im Gegensatz zu jenen aus *B. hyodysenteriae*, dürfte demnach eher auf Unterschiede in der Proteinsynthese zwischen den Brachyspiren und *E. coli* zurückzuführen sein, als möglicherweise auf einen Milieueinfluss, wie z. B. durch das Vorhandensein von Proteasen.

Die Transformanten induzierten beim Wachstum auf bluthaltigen Nährböden weder eine Hämolyse noch ein positives CAMP-Phänomen (**Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23**). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Untersucher (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). Sollten, wie bereits spekuliert wurde, Unterschiede in der posttranslationalen Prozessierung der Proteine zwischen *E. coli* und *B. hyodysenteriae* für das Fehlen der Aktivität verantwortlich sein, erklären diese Unterschiede jedoch nicht die Diskrepanz zu den Ergebnissen in der Literatur. Auch von den zitierten Untersuchern wurden Empfängerstämme von *E. coli* verwendet. Statt des in der vorliegenden Untersuchung verwandten BLR(DE3), einem B-Stamm Derivat, kam hier ein Abkömmling des Stammes K12 (DH5 $\alpha$ -Stämm) zur Anwendung. Beide Stämme werden weltweit mit vergleichbaren Erfolgen für die rekombinante DNS-Technologie benutzt. Mögliche stammspezifische Eigenschaften dürften daher auf die genannten Unterschiede kaum einen Einfluß ausgeübt haben. An Vektoren wurden von den zitierten Autoren, im Unterschied zu dem hier verwendeten Vektor pET-24b(+), die Vektoren pUC19 und pBluescript verwendet. Grundsätzlich sind diese Vektoren induzierbar. Da jedoch Angaben über eine Induktion vollständig fehlen, muss davon ausgegangen werden, dass die Proteinexpression ohne diesen Schritt erfolgte (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). In diesem Fall müssten eigene Promotoren mitkloniert worden sein. Welche Bedeutung diese mitklonierten Strukturen besitzen wurde von den Autoren nicht genannt. In der nachfolgenden **Abbildung 23** sind die in der vorliegenden Arbeit und die von anderen Untersuchern (Hsu et al. 2001) verwendeten Strategien zur Klonierung des HlyA vergleichend gegenübergestellt.

Nach den in der **Abbildung 23** aufgezeigten Strategien enthielten alle hämolysierenden Klone von Hsu et al. (2001) neben dem HlyA auch das Gen für FabG, bzw. die Gene für FabG und FabF. Da das in der eigenen Untersuchung, gemäß dem Leserahmen für das HlyA, hergestellte Protein biologisch nicht aktiv war und der Transformant ebenfalls keine Hämolyse induzierte, wurden im Anschluß die Klonierungsstrategien der oben erwähnten Untersucher kopiert, so dass nun ebenfalls Klone mit Genen für FabG und FabF sowie FabG, bzw. für FabF zur Verfügung standen. Mit keinem dieser Konstrukte ließen sich jedoch die Ergebnisse von Hsu et al. (2001) bestätigen. Um zu prüfen, ob möglicherweise die Fusion des Markermoleküls an das Protein einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hat, wurde zusätzlich das entsprechende *hlyA*-Gen ohne die das His-Tag kodierende

Sequenz kloniert ( $\text{ADhlyA}^-$ ). Auch dieser Schritt war in gleicher Weise erfolglos. Auch eine lange Inkubation der Transformanten zur Freisetzung intrazellulär gelagerter Proteine über die einsetzende Zelllyse (Fehlen entsprechender Signalsequenzen, s. **Kapitel 2.3.3**) zeigte keinen Erfolg.



**Abbildung 23: Strategien zur Klonierung des *hlyA***

**Erläuterungen:** *fabF* = Gen für FabF-Protein, *fabG* = Gen für FabG-Protein, *hlyA* = Gen für HlyA-Protein  
 ◀ = Gene; --- = nicht gesicherter Bereiche der Transformanten, — = gesicherter Bereich der Transformanten; X = Von Hsu et al. (2001) generierte Transformanten: alle hämolytisch (auf Blut-Agarplatten mit Rinderblut), Y = In dieser Arbeit generierte Transformanten: alle nicht hämolytisch (auf Blut-Agarplatten mit Blut verschiedener Tierarten).  
<sup>1</sup> = Quelle: *B. hyodysenteriae* Stamm WA1, PubMed Acc. Nr. NC\_012225.

Eine exakte Analyse der von Hsu et al. (2001) generierten Klone ist wegen unvollständiger Angaben leider nicht möglich. Eventuell war aber noch ein weiteres Gen, das *manB*, vorhanden. Dieses kodiert für eine Phosphomannomutase/Phosphoglucomutase. Diese Enzymfamilie beinhaltet Phosphoryltransferasen, die im Kohlenhydratstoffwechsel von Bedeutung sind. Des Weiteren könnten in zwei weiteren Klonen des Autors auch noch die Gene *crp* und *alkA* enthalten sein, welche für ein „cAMP-Binding-Protein“ bzw. eine „3-Methyl-Adenin D Glykosylase I“ kodieren. Ob diese drei Gene jedoch für eine hämolytische Aktivität Bedeutung haben ist nicht bekannt. Ein weiterer Klon des Autors enthielt zusätzlich ein dem *fabF* nachgelagertes Gen, das für ein hypothetisches Protein kodiert (Bellgard et al., 2009). Da dieses Gen und auch das Gen *fabF* nur in einem der drei hämolytischen Klone vollständig vorhanden war, scheinen beide Gene für die Hämolyse keine Rolle zu spielen. Einzig die Gene *fabG* und *manB* könnten, da sie in allen Klonen vorhanden waren, Bedeutung im Rahmen der Auslösung einer Hämolyse haben. Die klonierten Strukturen könnten *E. coli*-eigene Hämolsine hochregulieren (Oscarsson et al., 1996), oder Zyto-

plasmamembranen auflösen und so *E. coli* eigene Hämolsine ins Medium entlassen (Damman et al., 2000). Um endgültig zu prüfen, ob die Konstrukte von Hsu et al. (2001) tatsächlich hämolysieren, müssten die absolut identischen Gensequenzen über dieselben Vektoren kloniert werden. Dies war in der vorliegenden Arbeit aus den o. a. Gründen nicht in vollem Umfang durchzuführen. Nach dem Stand der eigenen Überprüfungen und neuer, exakter Klonierungsstrategien hätten aber Hsu et al. (2001) die Hämolyse nicht auf das HlyA zurückführen dürfen. Hierfür war die methodische Annäherungsweise der Autoren zu unpräzise.

### Schlussfolgerung

Für die Charakterisierung eines Proteins als Hämolsin ist die Untersuchung des fraglichen Proteins in isolierter Form unabdingbar (Damman et al., 2000; Carvalho et al., 2009; Carvalho et al., 2010). Von Seiten der Herstellung bieten sich hierbei rekombinante Proteine an. Die in der vorliegenden Arbeit streng nach den durch die Leserahmen der Hämolsingene vorgegebenen Nukleinsäuresequenzen hergestellten Proteine waren zwar antigen wirksam, jedoch biologisch nicht aktiv. Dies steht im Widerspruch zu den Kenntnissen aus dem Schrifttum. Alle bei *B. hyodysenteriae* jedoch bisher beschriebenen Experimente zur Hämolyse klonierter *E. coli*-Zellen lassen sich jeweils nur auf lediglich einen Klon zurückführen. Jeder dieser Klone enthielt neben dem Hämolsingen weitere Genabschnitte deren Funktion nicht bekannt war. Die von diesen Untersuchern generierten hämolysierenden Proteine (HlyA, TlyA-C) waren somit von Seiten der Herstellung nicht exakt zu präzisieren. Dieser Umstand macht in Verbindung mit den eigenen Ergebnissen die Beantwortung der Frage, ob es sich bei den genannten Proteinen tatsächlich um Hämolsine handelt, sehr schwierig. Es gibt auch in der Literatur, mit Ausnahme des TlyA-Proteins, erstaunlich wenig konkrete Informationen zu dieser Fragestellung.

Abschließend muss in Anbetracht der fehlgeschlagenen Experimente zur Erzeugung rekombinanter Hämolsine von *B. hyodysenteriae* auch die Frage gestellt werden, ob die bearbeiteten Proteine nicht eine andere Funktion besitzen. Es gibt keine nach strengen wissenschaftlichen Kriterien prüfbaren Belege für die Existenz, bzw. Nichtexistenz einer hämolytischen Aktivität der von den Hämolsingenen *hlyA* und *tlyA-C* abgeleiteten Proteine, außer den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen. Somit erscheinen Zweifel an der Funktion der bei Brachyspiren vorkommenden Proteine HlyA und TlyA-C als Hämolsine nicht ganz unberechtigt zu sein. Die Aufklärung der Hämolyse der Brachyspiren bleibt somit ein aktuelles Thema und sollte nach den Erfahrungen der vorliegenden Arbeit methodisch auch die Anwendung von Mutagenese-Verfahren einschließen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

*Brachyspira (B.) hyodysenteriae* ist der Erreger der Schweinedysenterie (SD). Diese Erkrankung ist weltweit verbreitet und spielt auch in Deutschland eine zunehmend größer werdende Rolle. Als bedeutungsvolle Mediatoren in der Pathogenese der Dysenterie stehen, neben anderen Faktoren, die Hämolysine des Erregers (vor allem HlyA und TlyA-C) zur Diskussion. Beispielsweise waren TlyA-Deletionsmutanten avirulent und Hämolysinextrakte von *B. hyodysenteriae* nach Injektion in „Darmloops“ stark schleimhautschädigend. Die Kenntnisse zu den einzelnen Hämolysinen sind jedoch lückenhaft und durch methodische Mängel belastet. Nach Klonierung der Gene *hlyA* und *tlyA-C* in *E. coli* wurden bisher lediglich die Transformanten, jedoch nicht die isolierten Proteine auf hämolysierende Fähigkeiten geprüft. Dabei wurden die für die Proteine kodierenden Gensequenzen nie alleine, sondern immer in Kombination mit flankierenden Gensequenzen kloniert. Studien an exakt vom entsprechenden Gen kodierten Proteinen liegen nicht vor.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die Hämolysingene von *B. hyodysenteriae* in *E. coli* kloniert und die exprimierbaren Proteine nach Reinigung sowohl auf ihre Antigenität und Reaktivität mit Seren infizierter Tiere, als auch auf ihre hämolysierenden und zytotoxischen Eigenschaften gegenüber verschiedenen Säugetiererythrozyten, bzw. -zellkulturen hin untersucht.

Insgesamt ließen sich acht Hämolysingene in *E. coli*-Zellen klonieren. Nur fünf dieser acht Transformanten (ADtlyA, ADtlyB, ADtlyC, ADhlyA und AD962) exprimierten jedoch die entsprechenden Proteine, von denen die rekombinanten Proteine rTlyA-His, rTlyB-His, rTlyC-His und rHlyA-His mittels Affinitätschromatographie über ein angehängtes Histidintag gereinigt werden konnten.

Die rekombinanten Hämolysine waren zwar antigen für Kaninchen, es zeigte jedoch nur eins der experimentell infizierten Schweine eine Serokonversion gegen TlyA. In Anbetracht der Tatsache, dass die anderen experimentell infizierten Schweine keine Serokonversion zu TlyA zeigten, wäre die Untersuchung einer größeren Stichprobe notwendig um eine verlässliche Aussage über die immunmodulatorischen Effekte von TlyA treffen zu können. Bei den anderen untersuchten Hämolysinen (TlyB-C und HlyA) konnte keine Serokonversion nachgewiesen werden.

Beim Wachstum auf festen Nährböden mit Blut von Rind, Schaf und Pferd bildeten die Transformanten keine Hämolysen aus. Auch führte keiner der Transformanten zu einem positiven CAMP-Phänomen. Extrakte aus den klonierten Bakterien sowie die gereinigten Hämolysine verursachten keine Hämolysen von gewaschenen Schaferythrozyten. Auch

konnte keine zytotoxische Wirkung auf Säugetierzellen durch die gereinigten rekombinanten Hämolysine nachgewiesen werden.

Auch weitere, entsprechend den Vorgaben aus der Literatur generierte HlyA-Transformanten (die Transformante ADfabUm, welche auch die benachbarten Gensequenzen *fabG* und *fabF* enthielt sowie die Klone ADfabG und ADfabF, welche nur die benachbarten Sequenzen *fabG* und *fabF* enthielten und ein Klon (ADhlyA<sup>-</sup>), welcher nur das *hlyA*-Gen ohne das Fusionsprotein („Histidintag“) enthielt) zeigten kein, wie von Hsu et al. (2001) beschrieben, hämolysierendes Wachstum auf Blut-Agarplatten.

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen kann somit die Frage, ob es sich bei den genannten Proteinen tatsächlich um Hämolysine handelt, nicht eindeutig beantwortet werden. Zweifel an der Funktion der bei Brachyspiren vorkommenden Proteine HlyA und TlyA-C als Hämolysine scheinen nicht ganz unberechtigt zu sein. Dennoch sind diese Proteine gute Antigene, wobei es aufgrund der fehlenden Serokonversion in Seren infizierter Tiere fraglich ist, ob hieraus eine immunrelevante Bedeutung resultiert.

## 7 SUMMARY

*Brachyspira (B.) hyodysenteriae* is the pathogen of Swine dysenterie (SD). This disease exists worldwide and is playing an increasing role in Germany. Beside other factors, the haemolysins (especially HlyA and TlyA-C) are discussed as significant mediators in the pathogenesis of the SD. TlyA negative mutants for example were avirulent and haemolysin-extracts damaged the intestinal mucosa of mice and pigs. But so far, the literature about these items is incomplete and exhibits methodical deficiencies. After cloning of *hlyA* and *tlyA-C*, only the transformants have been observed concerning their haemolytic properties, not the isolated proteins. In addition, the genes of interest have always been cloned in combination with flanking nucleotide sequences. So far, studies pertaining exclusively to the genes of interest do not exist.

In this study, the haemolysin genes from *B. hyodysenteriae* were cloned in an *E. coli* recipient strain. The expressable proteins were purified and examined regarding their antigenicity, their reactivity with sera from infected pigs and their haemolytic and cytotoxic effects on different erythrocytes and cell cultures.

Overall, eight haemolysin genes were successfully cloned into *E. coli*. Five of these transformants (ADhlyA, ADtlyA, ADtlyB, ADtlyC and AD962) expressed the haemolysin-protein and four of these proteins (rHlyA, rTlyA, rTlyB and rTlyC) were purified by affinity chromatography with an attached histidin-tag.

The recombinant proteins were antigenic in rabbits, whereas only a single experimentally infected pig in our sample showed a seroconversion to TlyA. A larger sample would be required to make a more conclusive statement regarding the immunomodulatory effects of TlyA. For the other Haemolysins(TlyB-C and HlyA) no seroconversion could be verified.

During the growth on solid culture media, with erythrocytes from horses, sheeps and cattle, the transformants did not form a haemolytic phenotype and did not lead to a positive CAMP-phenomenon. Extracts from the transformants and purified proteins did not cause haemolytic activity on sheep erythrocytes. Also in cell cultures with mammalian cells, the purified proteins had no cytotoxic effects.

Further studies on HlyA-transformants, which were generated in accordance with the specifications of literature (ADfabUm which also possessed the flanking genes *fabG* and *fabF*, ADfabG and ADfabF which possessed the genes *fabG* and *fabF* and the transformant ADhlyA<sup>-</sup> which possessed only the gene HlyA without the histidin-tag), did not present any haemolytic growth on blood agar plate even though Hsu et al. (2001) demonstrated haemolytic growth of these transformants.

According to current research results at this point, the question whether the proteins are true haemolysins cannot be answered unambiguously. Reasonable doubt of the function of the proteins HlyA and TlyA-C from *Brachyspira* as haemolysins appears to be justified. While the proteins are good antigens in rabbits, the absence of seroconversion in sera from infected pigs indicates that the proteins may not be immunologically relevant.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Achacha, M. and K. R. Mittal (1995). "Production and characterization of monoclonal antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* and *S. innocens* and their use in serotyping." J Clin Microbiol **33**(9): 2519-21.
- Alexander, A. D., O. H. Smith, et al. (1956). "Presence of hemolysin in cultures of pathogenic leptospire." Proc Soc Exp Biol Med **91**(2): 205-11.
- Alves, V. A., L. C. Gayotto, et al. (1992). "Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage." Exp Toxicol Pathol **44**(7): 425-34.
- Arakawa, S. and H. K. Kuramitsu (1994). "Cloning and sequence analysis of a chymotrypsinlike protease from *Treponema denticola*." Infect Immun **62**(8): 3424-33.
- Baida, G. E. and N. P. Kuzmin (1995). "Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*." Biochim Biophys Acta **1264**(2): 151-4.
- Baida, G. E. and N. P. Kuzmin (1996). "Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*." Biochim Biophys Acta **1284**(2): 122-4.
- Barth, S., M. Gommel, et al. (2012). "Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs." Vet Microbiol **155**(2-4): 438-43.
- Bateman, A. (1997). "The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein." Trends Biochem Sci **22**(1): 12-3.
- Baum, D. H. and L. A. Joens (1979). "Partial purification of a specific antigen of *Treponema hyodysenteriae*." Infect Immun **26**(3): 1211-3.
- Baum, D. H. and L. A. Joens (1979). "Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*." Infect Immun **25**(3): 792-6.
- Beauchamp, R. O., Jr., J. S. Bus, et al. (1984). "A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity." Crit Rev Toxicol **13**(1): 25-97.
- Bellgard, M. I., P. Wanchanthuek, et al. (2009). "Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine." PLoS ONE **4**(3): e4641.
- Berglund, L., J. Andrade, et al. (2008). "The epitope space of the human proteome." Protein Sci **17**(4): 606-13.
- Bernheimer, A. W. and R. F. Bey (1986). "Copurification of *Leptospira interrogans* serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C." Infect Immun **54**(1): 262-4.
- Bhakdi, S., N. Mackman, et al. (1986). "*Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores." Infect Immun **52**(1): 63-9.
- Borchert, O. (2004). cGMP-abhängige Signalwege in Spermatozoen des Rindes. Institut für Anatomie III des Zentrums für Experimentelle Medizin. Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg.
- Boye, M., S. B. Baloda, et al. (2001). "Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms." Vet Microbiol **81**(1): 33-40.
- Branger, C., B. Chatrenet, et al. (2005). "Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1." Infect Immun **73**(7): 4062-9.
- Branger, C., C. Sonrier, et al. (2001). "Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination." Infect Immun **69**(11): 6831-8.
- Carr, G., N. Simmons, et al. (2003). "A role for CBS domain 2 in trafficking of chloride channel CLC-5." Biochem Biophys Res Commun **310**(2): 600-5.



- Carvalho, E., A. S. Barbosa, et al. (2009). "Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity." FEBS Lett **583**(8): 1381-5.
- Carvalho, E., A. S. Barbosa, et al. (2010). "Evaluation of the Expression and Protective Potential of Leptospiral sphingomyelinases." Curr Microbiol **60**(2): 134-42.
- Chan, E. C. and R. McLaughlin (2000). "Taxonomy and virulence of oral spirochetes." Oral Microbiol Immunol **15**(1): 1-9.
- Chu, L., A. Burgum, et al. (1995). "The 46-kilodalton-hemolysin gene from *Treponema denticola* encodes a novel hemolysin homologous to aminotransferases." Infect Immun **63**(11): 4448-55.
- Chu, L., J. L. Ebersole, et al. (1997). "Cystalysin, a 46-kilodalton cysteine desulfhydrase from *Treponema denticola*, with hemolytic and hemoxidative activities." Infect Immun **65**(8): 3231-8.
- Chu, L., J. L. Ebersole, et al. (1999). "Cystalysin, a 46-kDa L-cysteine desulfhydrase from *Treponema denticola*: biochemical and biophysical characterization." Clin Infect Dis **28**(3): 442-50.
- Chu, L. and S. C. Holt (1994). "Purification and characterization of a 45 kDa hemolysin from *Treponema denticola* ATCC 35404." Microb Pathog **16**(3): 197-212.
- Chu, L., W. Kennell, et al. (1994). "Characterization of hemolysis and hemoxidation activities by *Treponema denticola*." Microb Pathog **16**(3): 183-95.
- Dain, A. A., M. N. Rozinov, et al. (1985). "[Cloning and the expression of the hemolysin gene of *Leptospira pomona pomona* in *Escherichia coli*]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(7): 7-10.
- Damman, C. J., C. H. Eggers, et al. (2000). "Characterization of *Borrelia burgdorferi* BlyA and BlyB proteins: a prophage-encoded holin-like system." J Bacteriol **182**(23): 6791-7.
- De Gier, J., I. Mulder, et al. (1961). "On the specific lipid composition of red cell membranes." Naturwissenschaften **48**: 54.
- del Real, G., R. P. Segers, et al. (1989). "Cloning of a hemolysin gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo." Infect Immun **57**(8): 2588-90.
- Dempsey, C. E. (1990). "The actions of melittin on membranes." Biochim Biophys Acta **1031**(2): 143-61.
- Dobrina, A., E. Nardon, et al. (1995). "*Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes." Infect Immun **63**(8): 2995-9.
- Duthie, I. F. (1966). "Swine dysentery." Riv. Suinic **7**: 61-64.
- Eggers, C. H. and D. S. Samuels (1999). "Molecular evidence for a new bacteriophage of *Borrelia burgdorferi*." J Bacteriol **181**(23): 7308-13.
- Egli, C., W. K. Leung, et al. (1993). "Pore-forming properties of the major 53-kilodalton surface antigen from the outer sheath of *Treponema denticola*." Infect Immun **61**(5): 1694-9.
- Fenno, J. C. and B. C. McBride (1998). "Virulence factors of oral treponemes." Anaerobe **4**(1): 1-17.
- Fenno, J. C., K. H. Muller, et al. (1996). "Sequence analysis, expression, and binding activity of recombinant major outer sheath protein (Msp) of *Treponema denticola*." J Bacteriol **178**(9): 2489-97.
- Fenno, J. C., G. W. Wong, et al. (1997). "Conservation of msp, the gene encoding the major outer membrane protein of oral *Treponema* spp." J Bacteriol **179**(4): 1082-9.
- Fisher, L. F. and H. J. Olander (1981). "Shedding of *Treponema hyodysenteriae*, transmission of disease, and agglutinin response to pigs convalescent from swine dysentery." Am J Vet Res **42**(3): 450-5.

- Fitton, J. E., A. Dell, et al. (1980). "The amino acid sequence of the delta haemolysin of *Staphylococcus aureus*." FEBS Lett **115**(2): 209-12.
- Freer, J. H. and J. P. Arbuthnott (1982). "Toxins of *Staphylococcus aureus*." Pharmacol Ther **19**(1): 55-106.
- Freer, J. H. and T. H. Birkbeck (1982). "Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*." J Theor Biol **94**(3): 535-40.
- Fussle, R., S. Bhakdi, et al. (1981). "On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin." J Cell Biol **91**(1): 83-94.
- Gilmore, M. S., A. L. Cruz-Rodz, et al. (1989). "A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage." J Bacteriol **171**(2): 744-53.
- Glock, R. D., D. L. Harris, et al. (1974). "Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery." Infect Immun **9**(1): 167-78.
- Goldstein, S. F. and N. W. Charon (1990). "Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 4895-9.
- Greer, J. M. and M. J. Wannemuehler (1989). "Comparison of the biological responses induced by lipopolysaccharide and endotoxin of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*." Infect Immun **57**(3): 717-23.
- Grenier, D. (1991). "Characteristics of hemolytic and hemagglutinating activities of *Treponema denticola*." Oral Microbiol Immunol **6**(4): 246-9.
- Grossman, T. H., E. S. Kawasaki, et al. (1998). "Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability." Gene **209**(1-2): 95-103.
- Guina, T. and D. B. Oliver (1997). "Cloning and analysis of a *Borrelia burgdorferi* membrane-interactive protein exhibiting haemolytic activity." Mol Microbiol **24**(6): 1201-13.
- Haake, D. A., G. Chao, et al. (2000). "The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection." Infect Immun **68**(4): 2276-85.
- Haapasalo, M., K. H. Muller, et al. (1992). "Characterization, cloning, and binding properties of the major 53-kilodalton *Treponema denticola* surface antigen." Infect Immun **60**(5): 2058-65.
- Hampson, D. J., J. R. Mhoma, et al. (1989). "Proposed revisions to the serological typing system for *Treponema hyodysenteriae*." Epidemiol Infect **102**(1): 75-84.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Harris, D. L., R. D. Glock, et al. (1972). "Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease." Vet Med Small Anim Clin **67**(1): 61-4.
- Harris, D. L. D. J. H. a. R. D. G. (1999). Swine Dysentery, Blackwell, Oxford.
- Hauk, P., S. Negrotto, et al. (2005). "Expression and characterization of HlyX hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*: potentiation of hemolytic activity by LipL32." Biochem Biophys Res Commun **333**(4): 1341-7.
- Hebeisen, S., A. Biela, et al. (2004). "The role of the carboxyl terminus in CIC chloride channel function." J Biol Chem **279**(13): 13140-7.
- Heppel, L. A. (1967). "Selective release of enzymes from bacteria." Science **156**(781): 1451-5.
- Herbst, W., H. Willems, et al. (2004). "Verbreitung von *Brachyspira hyodysenteriae* und *Lawsonia intracellularis* bei gesunden und durchfallkranken Schweinen." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **117**(11-12): 493-8.
- Hsu, T., D. L. Hutto, et al. (2001). "Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*." Infect Immun **69**(2): 706-11.

- Hutto, D. L. and M. J. Wannemuehler (1999). "A comparison of the morphologic effects of *Serpulina hyodysenteriae* or its beta-hemolysin on the murine cecal mucosa." Vet Pathol **36**(5): 412-22.
- Hyatt, D. R. and L. A. Joens (1997). "Analysis of the lytic activity of the *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin." Infect Immun **65**(11): 4877-9.
- Hyatt, D. R., A. A. ter Huurne, et al. (1994). "Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain." Infect Immun **62**(6): 2244-8.
- Ignoul, S. and J. Eggermont (2005). "CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins." Am J Physiol Cell Physiol **289**(6): C1369-78.
- Isogai, E., H. Isogai, et al. (1986). "Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **261**(1): 53-64.
- Ivanova, N., S. Gronow, et al. (2009). "Complete genome sequence of *Leptotrichia buccalis* type strain (C-1013-b)." Stand Genomic Sci **1**(2): 126-32.
- Joens, L. A., S. C. Whipp, et al. (1983). "Serotype-specific protection against *Treponema hyodysenteriae* infection in ligated colonic loops of pigs recovered from swine dysentery." Infect Immun **39**(1): 460-2.
- Johansen, T., F. B. Haugli, et al. (1988). "*Bacillus cereus* strain SE-1: nucleotide sequence of the sphingomyelinase C gene." Nucleic Acids Res **16**(21): 10370.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Kärber, G. (1931). "Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche." (4): 480-483.
- Karunakaran, T. and S. C. Holt (1994). "Cloning and expression of hemolysin genes from *Treponema denticola* strains ATCC 35404 (TD-4) and human clinical isolate GM-1 in *Escherichia coli*." Microb Pathog **16**(5): 337-48.
- Kasarov, L. B. (1970). "Degradation of the erythrocyte phospholipids and haemolysis of the erythrocytes of different animal species by leptospirae." J Med Microbiol **3**(1): 29-37.
- Kasarov, L. B. and L. Addamiano (1969). "Degradation of the phospholipids of the serum lipoproteins by leptospirae." J Med Microbiol **2**(3): 243-8.
- Kemp, B. E. (2004). "Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract." J Clin Invest **113**(2): 182-4.
- Kennedy, G. A. and A. C. Strafuss (1976). "Scanning electron microscopy of the lesions of swine dysentery." Am J Vet Res **37**(4): 395-401.
- Kennedy, M. J., E. L. Rosey, et al. (1997). "Characterization of *flaA*- and *flaB*- mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization." FEMS Microbiol Lett **153**(1): 119-28.
- Kennedy, M. J., D. K. Rosnick, et al. (1988). "Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa." J Gen Microbiol **134**(6): 1565-76.
- Kennedy, M. J. and R. J. Yancey, Jr. (1996). "Motility and chemotaxis in *Serpulina hyodysenteriae*." Vet Microbiol **49**(1-2): 21-30.
- Kent, K. A., R. M. Lemcke, et al. (1988). "Production, purification and molecular weight determination of the haemolysin of *Treponema hyodysenteriae*." J Med Microbiol **27**(3): 215-24.
- Kinyon, J. M., D. L. Harris, et al. (1977). "Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*." Infect Immun **15**(2): 638-46.
- Kmety, E., I. Plesko, et al. (1966). "Evaluation of methods for differentiating pathogenic and saprophytic leptospira strains." Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol **46**(1): 111-22.
- Knoop, F. C. (1981). "Investigation of a hemolysin produced by enteropathogenic *Treponema hyodysenteriae*." Infect Immun **31**(1): 193-8.

- Knoop, F. C., G. D. Schrank, et al. (1979). "In-vitro attachment of *Treponema hyodysenteriae* to mammalian epithelial cells." *Can J Microbiol* **25**(3): 399-405.
- Kojima, T., Y. Yanagihara, et al. (1984). "Characterization of inhibitor to leptospiral hemolysin present in bovine serum." *Microbiol Immunol* **28**(3): 291-302.
- Krug, E. L. and C. Kent (1984). "Phospholipase C from *Clostridium perfringens*: preparation and characterization of homogeneous enzyme." *Arch Biochem Biophys* **231**(2): 400-10.
- La, T., P. Tan, et al. (2005). "The distribution of bmpB, a gene encoding a 29.7 kDa lipoprotein with homology to MetQ, in *Brachyspira hyodysenteriae* and related species." *Vet Microbiol* **107**(3-4): 249-56.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lee, S. H., K. A. Kim, et al. (2000). "Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai." *Gene* **254**(1-2): 19-28.
- Lee, S. H., S. Kim, et al. (2002). "Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells." *Infect Immun* **70**(1): 315-22.
- Liu, P. V. (1974). "Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Infect Dis* **130** Suppl(0): S94-9.
- Loesche, W. J. (1988). "The role of spirochetes in periodontal disease." *Adv Dent Res* **2**(2): 275-83.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Cheng, J.-F., Bruce, D., L. Goodwin, Pitluck, S., Chertkov, O., Detter, J. C., Han, C., Tapia, R., et al. (2010). Complete sequence of *Clostridium saccharolyticum* WM1.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., Glavina del Rio, T., Tice, H., D. Bruce, Goodwin, L., Pitluck, S., Chertkov, O., Brettin, T., et al. (2009). Complete sequence of chromosome of *Geobacillus* sp. Y412MC61.
- Ludwig, A., C. von Rhein, et al. (2008). "Release of latent ClyA cytotoxin from *Escherichia coli* mediated by a bacteriophage-associated putative holin (BlyA) from *Borrelia burgdorferi*." *Int J Med Microbiol* **298**(5-6): 473-81.
- Lysons, R. J., K. A. Kent, et al. (1991). "A cytotoxic haemolysin from *Treponema hyodysenteriae*--a probable virulence determinant in swine dysentery." *J Med Microbiol* **34**(2): 97-102.
- MacDougall, J. H., D. Beighton, et al. (1991). "Cloning and expression of protease genes from *Treponema denticola* in *Escherichia coli*." *Oral Microbiol Immunol* **6**(5): 270-4.
- Makinen, P. L., K. K. Makinen, et al. (1995). "Role of the chymotrypsin-like membrane-associated proteinase from *Treponema denticola* ATCC 35405 in inactivation of bioactive peptides." *Infect Immun* **63**(9): 3567-75.
- Mangel, A., J. M. Leitao, et al. (1992). "Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*." *Eur J Biochem* **210**(2): 499-507.
- Mapother, M. E. and L. A. Joens (1985). "New serotypes of *Treponema hyodysenteriae*." *J Clin Microbiol* **22**(2): 161-4.
- Martoglio, B. and B. Dobberstein (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." *Trends Cell Biol* **8**(10): 410-5.
- Mikx, F. H. and R. A. Keulers (1992). "Hemagglutination activity of *Treponema denticola* grown in serum-free medium in continuous culture." *Infect Immun* **60**(5): 1761-6.
- Muir, S., M. B. Koopman, et al. (1992). "Cloning and expression of a *Serpula* (*Treponema*) *hyodysenteriae* hemolysin gene." *Infect Immun* **60**(2): 529-35.
- Murphy, K., P. Travers, et al. (2009). *Janeway Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Noronha, F. S., F. J. Ramalho-Pinto, et al. (1996). "Cytolytic activity in the genus *Leishmania*: involvement of a putative pore-forming protein." *Infect Immun* **64**(10): 3975-82.

- Nuessen, M. E., L. A. Joens, et al. (1983). "Involvement of lipopolysaccharide in the pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*." J Immunol **131**(2): 997-9.
- Oscarsson, J., Y. Mizunoe, et al. (1999). "Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*." Mol Microbiol **32**(6): 1226-38.
- Oscarsson, J., Y. Mizunoe, et al. (1996). "Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the slyA gene product." Mol Microbiol **20**(1): 191-9.
- Paster, B. J. and F. E. Dewhirst (2000). "Phylogenetic foundation of spirochetes." J Mol Microbiol Biotechnol **2**(4): 341-4.
- Persson, S. (1992). "Hydrogen sulfide and methyl mercaptan in periodontal pockets." Oral Microbiol Immunol **7**(6): 378-9.
- Picardeau, M., D. M. Bulach, et al. (2008). "Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis." PLoS One **3**(2): e1607.
- Pinkney, M., E. Beachey, et al. (1989). "The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity." Infect Immun **57**(8): 2553-8.
- Pohlenz, J. F., S. C. Whipp, et al. (1983). "[Pathogenesis of swine dysentery caused by *Treponema hyodysenteriae*]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **90**(9): 363-7.
- Projan, S. J., J. Kornblum, et al. (1989). "Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*." Nucleic Acids Res **17**(8): 3305.
- Que, X. C. and H. K. Kuramitsu (1990). "Isolation and characterization of the *Treponema denticola* *prtA* gene coding for chymotrypsinlike protease activity and detection of a closely linked gene encoding PZ-PLGPA-hydrolyzing activity." Infect Immun **58**(12): 4099-105.
- Rasback, T., D. S. Jansson, et al. (2007). "A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov." Environ Microbiol **9**(4): 983-91.
- Redfearn, M. S. (1964). "Toxic Lysolipoid: Isolation From *Pseudomonas Pseudomallei*." Science **146**: 648-9.
- Ren, S. X., G. Fu, et al. (2003). "Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing." Nature **422**(6934): 888-93.
- Richter (2009). Untersuchungen zur Immunogenität verschiedener äußerer Membranproteine von *Brachyspira hyodysenteriae* im Zellkultur-Adhärenz-Modell. Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Rizzo, A. A. (1967). "The possible role of hydrogen sulfide in human periodontal disease. I. Hydrogen sulfide production in periodontal pockets." Periodontics **5**(5): 233-6.
- Rowe, G. E. and R. A. Welch (1994). "Assays of hemolytic toxins." Methods Enzymol **235**: 657-67.
- Rydman, P. S. and D. H. Bamford (2003). "Identification and mutational analysis of bacteriophage PRD1 holin protein P35." J Bacteriol **185**(13): 3795-803.
- Saida, F., M. Uzan, et al. (2006). "Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools." Curr Protein Pept Sci **7**(1): 47-56.
- Sattler, S. (2010). Untersuchungen zur Klinik, Pathologie und Pathogenese der experimentellen *Brachyspira-hyodysenteriae*-Infektion beim Schwein. Hannover, Tierärztliche Hochschule.
- Scott, J. W., S. A. Hawley, et al. (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." J Clin Invest **113**(2): 274-84.
- Segers, R. P., A. van der Drift, et al. (1990). "Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*." Infect Immun **58**(7): 2177-85.

- Segers, R. P., J. A. van Gestel, et al. (1992). "Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family Leptospiraceae." Infect Immun **60**(4): 1707-10.
- Shinoda, S., S. Miyoshi, et al. (1985). "Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin." Microbiol Immunol **29**(7): 583-90.
- Spearman, C. (1908). "The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae." Brit. J. Psychol. **2**: 227-242.
- Stamm, L. V., F. C. Gherardini, et al. (1991). "Heat shock response of spirochetes." Infect Immun **59**(4): 1572-5.
- Stanton, T. B. (1992). "Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov." Int J Syst Bacteriol **42**(1): 189-90.
- Stanton, T. B., E. L. Rosey, et al. (1999). "Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery." Appl Environ Microbiol **65**(11): 5028-34.
- Taylor, D. J. and T. J. Alexander (1971). "The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete." Br Vet J **127**(11): 58-61.
- ter Huurne, A. A. and W. Gaastra (1995). "Swine dysentery: more unknown than known." Vet Microbiol **46**(4): 347-60.
- ter Huurne, A. A., S. Muir, et al. (1994). "Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins." Microb Pathog **16**(4): 269-82.
- ter Huurne, A. A., M. van Houten, et al. (1992). "Inactivation of a *Serpula* (*Treponema*) *hyodysenteriae* hemolysin gene by homologous recombination: importance of this hemolysin in pathogenesis in mice." FEMS Microbiol Lett **71**(1): 109-13.
- Terwilliger, T. C. and D. Eisenberg (1982). "The structure of melittin. II. Interpretation of the structure." J Biol Chem **257**(11): 6016-22.
- Thomas, W. and R. Sellwood (1993). "Molecular cloning, expression, and DNA sequence analysis of the gene that encodes the 16-kilodalton outer membrane lipoprotein of *Serpulina hyodysenteriae*." Infect Immun **61**(3): 1136-40.
- Thompson, J. C. (1986). "Morphological changes in red blood cells of calves caused by *Leptospira interrogans* serovar pomona." J Comp Pathol **96**(5): 517-27.
- Thompson, J. C. and B. W. Manktelow (1986). "Pathogenesis and red blood cell destruction in haemoglobinaemic leptospirosis." J Comp Pathol **96**(5): 529-40.
- Titball, R. W. (1993). "Bacterial phospholipases C." Microbiol Rev **57**(2): 347-66.
- Trowbridge, A. A., J. B. Green, 3rd, et al. (1981). "Hemolytic anemia associated with leptospirosis. Morphologic and lipid studies." Am J Clin Pathol **76**(4): 493-8.
- Vermoote, M., T. T. Vandekerckhove, et al. (2011). "Genome sequence of *Helicobacter suis* supports its role in gastric pathology." Vet Res **42**(1): 51.
- Wanchanthuek, P., M. I. Bellgard, et al. (2010). "The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes." PLoS One **5**(7): e11455.
- Wang, I. N., D. L. Smith, et al. (2000). "Holins: the protein clocks of bacteriophage infections." Annu Rev Microbiol **54**: 799-825.
- Wannemuehler, M. J., D. Akili, D. Hutto, K. Harkins, M. Crump and M. J. Schmerr (1994). "The pathogenic potential of a  $\beta$ -haemolysin from *Serpulina hyodysenteriae*." J. Cell. Biochem Suppl. **18A**: 63.
- Weinstock, G. M., J. M. Hardham, et al. (1998). "The genome of *Treponema pallidum*: new light on the agent of syphilis." FEMS Microbiol Rev **22**(4): 323-32.
- Whiting, R. A., L. P. Doyle, et al. (1921). "Swine dysentery." Purdue Univ. Agric. Exp. Stn. Bull **257**: 3-15.

- Wilcock, B. P. and H. J. Olander (1979). "Studies on the pathogenesis of swine dysentery. II. Search for a cytotoxin in spirochetal broth cultures and colon content." Vet Pathol **16**(5): 567-73.
- Williams, L. R. and F. E. Austin (1992). "Hemolytic activity of *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun **60**(8): 3224-30.
- Yamada, A., N. Tsukagoshi, et al. (1988). "Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*." Eur J Biochem **175**(2): 213-20.
- Young, R. and U. Blasi (1995). "Holins: form and function in bacteriophage lysis." FEMS Microbiol Rev **17**(1-2): 191-205.
- Zhang, Y. X., Y. Geng, et al. (2005). "Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from *Leptospira interrogans* serogroup *Icterohae-morrhagiae* serovar *Lai*." Acta Pharmacol Sin **26**(4): 453-61.
- Zhang, Y. X., Y. Geng, et al. (2008). "Cytotoxic activity and probable apoptotic effect of Sph2, a sphingomyelinase hemolysin from *Leptospira interrogans* strain *Lai*." BMB Rep **41**(2): 119-25.
- Zuerner, R. L., T. B. Stanton, et al. (2004). "Genetic variation in Brachyspira: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*." Anaerobe **10**(4): 229-37.

## 9 ANHANG

### Verwendete Puffer und Medien:

#### Anodenpuffer I

Tris-Puffer (1 M)	300 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	500 ml

#### Anodenpuffer II

Tris-Puffer (1 M)	25 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	770 ml

#### BHI-Medium

Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Kat.Nr.: 10493	37 g
A. dest.	ad 1.000 ml

#### BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium

Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Kat.Nr.: 10493	37 g
Colistin	6,23 mg
Vancomycin	6 mg
Spectinomycin	200 mg
Spiramycin	15,25 mg
Rifampicin	12,5 mg
A. dest.	ad 1.000 ml
FKS (Fötales Kälberserum) – immer frisch zugesetzt	20 %

#### Blut-Agarplatten (BAP)

Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.10886.0500	40 g
defibriniertes Blut (Schaf, Rind oder Pferd)	50 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

#### Chloronaphthol-Methanol

4-Chloro-1-Naphthol	3 mg
Methanol	1 ml

#### DST-Agar

DST-Agar (Fa. Oxoid GmbH, Wesel, Kat.Nr. CM 261)	40 g
defibriniertes Rinderblut	50 ml
A. dest.	ad 1000 ml

#### Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

Tris	242 g
Eisessig	57,10 g
Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml



**Elutionspuffer, pH 8,0**

50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,9 g
300 mM NaCl	17,54 g
250 mM Imidazol	17,0 g
A. dest.	ad 1.000 ml
pH-Wert einstellen mit NaOH	

**Gassner-Agar**

Fa. Oxoid GmbH, Wesel, Kat.Nr.: GF601B	77 g
A. dest.	ad 1.000 ml

**HE-Puffer**

1mM Glukose	0,018 g
1 mM MgSO <sub>4</sub>	0,012 g
0,05 % Hefe RNS	0,05 g
PBS	ad 100 ml

**Kathodenpuffer**

6-Aminocaprinsäure	5,25 g
Tris-Puffer (1 M)	25 ml
Methanol	200 ml
A. dest.	770 ml

**Ladepuffer**

Bromphenolblau	25 mg
Ficoll	1,5 g
A. dest.	9,5 ml

**Lämmli-Puffer, pH 6,8**

Tris-Cl (0,5 M, pH 6,8)	1 ml
Glycerol (87 %)	0,8 ml
SDS (10 %)	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
Bromphenolblau	0,02 g
A. dest.	4 ml
pH-Wert einstellen mit 37 % HCl	

**Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung**

Gene Ruler™ 100 bp DNS Ladder Plus	0,01 ml
6x Loading Dye Solution (Fa. Fermentas, St. Leon-Roth, Kat.Nr. R0611)	0,03 ml
A. dest.	0,12 ml

**Lysogeny Broth (LB-) Medium**

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1M)	4 ml
A. dest.	ad 1.000 ml
pH mit NaOH 1 N einstellen	8,2

**LBM<sup>T</sup>**

LB-Medium	100 ml
Tetracyclin (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg)	1,25 mg

**LBM<sup>KT</sup>**

LB-Medium	100 ml
Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg)	3 mg
Tetracyclin (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg)	1,25 mg

**Lysogeny Broth-(LB-) Agar**

Bacto-Trypton	10 g
Bacto-Agar	16 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
NaOH (1M)	4 ml
A. dest.	ad 1.000 ml
pH mit NaOH 1 N einstellen	8,2

**LBA<sup>T</sup>**

LB-Agar	100 ml
Tetracyclin (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg)	1,25 mg

**LBA<sup>KT</sup>**

LB-Agar	100 ml
Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg)	3 mg
Tetracyclin (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg)	1,25 mg

**Lysis-Puffer, pH 8,0**

50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,9 g
300 mM NaCl	17,54 g
10 mM Imidazol	0,68 g
A. dest	ad 1.000 ml
pH-Wert einstellen mit NaOH	

**M9-Medium**

M9 Salts	200 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	2 ml
20 %ige Glukose Lösung	20 ml
1 M CaCl <sub>2</sub>	100 µl
10 % Casamino Acids	20 ml
A. dest	ad 1000 ml

**M9-Salts**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5 g
A. dest	ad 1000 ml

**Müller-Hinton-Agar**

Müller Hinton Nährboden (Fa. Oxoid GmbH, Wesel Art. Nr. CM 337)	38 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
A. dest	ad 1000 ml

**PBS (pH 7,4)**

NaCl	10 g
KCl	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,8 g
A. dest.	ad 1000 ml

**PBS-Tween (pH 7,2)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,47 g
NaCl	8,18 g
Tween 20 (0,05 %)	0,5 ml
A. dest.	ad 1000 ml

**pH-Elutionspuffer, pH 3,0**

75 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,35 g
300 mM NaCl	17,54 g
150 mM Zitronensäure	31,5 g
5 % Glycerin	50 ml
A. dest	ad 1.000 ml
pH-Wert einstellen mit HCl	

**pH-Waschpuffer, pH 6,0**

150 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20,7 g
300 mM NaCl	17,54 g
20 mM Zitronensäure	4,2 g
5 % Glycerin	50 ml
A. dest	ad 1.000 ml
pH-Wert einstellen mit HCl	

**Puffer B, pH 8,0**

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,8 g
10 mM Tris-Cl	1,2 g
8 M Harnstoff	480,5 g
A. dest	ad 1.000 ml
pH-Wert einstellen mit NaOH	

**Schädler-Agar**

Fa. Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA, Kat.Nr.: 212189	41,9 g
defibriniertes Schafblut	
A. dest.	50 ml
	ad 1.000 ml

**SDS-Elektrophorese-Laufpuffer**

Glycin	14,4 g
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	1 g
Tris	3,03 g
A. dest.	ad 1000 ml

**SDS-Sammelgel (Mini, 4,5 %)**

Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	250 µl
Acrylamid-Bisacrylamid 50:1,5	250 µl
SDS (20 %)	12,5 µl
Harnstoff (8 M)	1,5 ml
APS (10 %)	75 µl
TEMED	2,5 µl
A. dest.	450 µl

**SDS-Trenngel (Mini, 12,5 %)**

Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
Acrylamid-Bisacrylamid 30:0,8	5 ml
SDS (20 %)	62,5 µl
Harnstoff (8 M)	3,75 ml
APS (10 %)	60 µl
TEMED	10 µl
A. dest.	890 µl

**Serumbouillon**

Standard-I-Nährbouillon	25 g
Rinderserum	100 ml
A. dest.	ad 1.000 ml

**TFB1 (pH 5,8)**

KAc (1 M)	6 ml
MnCl <sub>2</sub> (1 M)	10 ml
KCl (1 M)	20 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	2 ml
Glycerin (87 %ig)	34,5 ml
A.dest.	ad 200 ml

**TFB2 (pH 7,0)**

NaMops, pH 7,0 (1 M)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	7,5 ml
KCl (1 M)	1 ml
Glycerin (87 %ig)	17,25 ml
A. dest.	ad 100 ml

**Tris-Puffer (1 M, ungepuffert)**

Tris	121,14 g
A. dest.	ad 1000 ml

**TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar (mit Schafblut)**

Caso-Agar: Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Kat.Nr.: 1.05458.0500	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
Colistin	6,23 mg
Vancomycin	6 mg
Spectinomycin	200 mg
Spiramycin	15,25 mg
Rifampicin	12,5 mg
A. dest.	ad 1.000 ml

**Waschpuffer, pH 8,0**

50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,9 g
300 mM NaCl	17,54 g
20 mM Imidazol	1,36 g
A. dest	ad 1.000 ml
pH-Wert einstellen mit NaOH	

**Zeissler-Agar (ohne Antibiotika)**

Columbia-Agar (Basis) Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Kat.Nr. 110455	42 g
Glukose	ao g
Schafblut	50 ml
A. dest	ad 1000 ml

## 10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### 10.1 Abbildungen

Abbildung 1:	Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-7-05.....	25
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Standardverfahren des CAMP-Tests.....	28
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Kombinationsverfahrens des CAMP-Tests. ...	28
Abbildung 4:	Präparationsschritte und Bezeichnung der r962-His Fraktionen im Rahmen der Reinigung .....	37
Abbildung 5:	Elektropherogramm der Insertspezifischen pET-PCR der Serotyp-Referenzstämme mittels <i>tlyA</i> -spezifischer Primer .....	47
Abbildung 6:	Agarosegelelektrophorese der Inserts jeweils vor und nach Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>EcoRI</i> .....	48
Abbildung 7	Elektropherogramm der insertumgreifenden pET-PCR der Hämolyisin-Transformanten.....	50
Abbildung 8	Elektropherogramm der Insertumgreifenden pET-PCR der hlyA-Transformanten.....	50
Abbildung 9:	Detektion von rTlyB-His, r962-His und rTlyA-His mittels Ni-NTA-HRP-Konjugat nach SDS-PAGE und Westernblot. ....	52
Abbildung 10:	Elektropherogramm der Fraktionen im Rahmen der affinitätschromatografischen Reinigung des rHlyA-His. ....	52
Abbildung 11:	Detektion (Ni-NTA-HRP-Konjugat) nach Westernblot der r962-His Fraktionen im Rahmen der Reinigung. ....	54
Abbildung 12:	Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE (A) und Immunodetektion (Ni-NTA-HRP Konjugat) nach Westernblot (B) der umgepufferten und filtrierten rekombinanten Proteine .....	55
Abbildung 13:	SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) (A) und Immunoblot (B) zum Nachweis des HlyA-His und HlyA-Proteins in verschiedenen Induktionsansätzen mittels des Serums CH 1242 (Anti-rHlyA-His). ....	56
Abbildung 14:	Serokonversion bei einem Kaninchen nach Immunisierung mit gereinigtem rTlyC-His im Immunoblot.....	59
Abbildung 15:	Reaktionen der anti-rHämolyisin-Seren mit affinitätschromatografisch gereinigtem rTlyC-His im Immunoblot.. ....	61
Abbildung 16:	TlyB-Detektion in Ganzzelllysaten der <i>B. hyodysenteriae</i> -Serotyp-Referenzstämme durch das rTlyB-His spezifische Antiserum vom Kaninchen im Immunoblot. ....	63

Abbildung 17: Ergebnis der Untersuchung des B204-HE-Extrakts mit rHämolysin-spezifischen Antiseren vom Kaninchen im Immunoblot.....	63
Abbildung 18: Antikörpernachweis gegen rTlyC-His in Seren infizierter Schweine im Immunoblot. ....	64
Abbildung 19: Antikörper gegen TlyA-His in Seren von experimentell mit <i>B. hyodysenteriae</i> -infizierten Schweinen im Immunoblot. ....	65
Abbildung 20: Temperatureinfluss auf die Aktivität eines hämolysierenden Extraktes von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204.....	67
Abbildung 21: Hämolymehemmtest unter Verwendung verschiedener Antiseren gegen die rHämolysine nach 30 minütiger Inkubation.....	69
Abbildung 22: Reduktion der Hämolymse durch die rHämolysin-spezifischen Antiseren nach 10 minütiger Inkubation in ausgewählten Verdünnungsstufen im Vergleich ..	69
Abbildung 23: Strategien zur Klonierung des <i>hlyA</i> .....	86

## 10.2 Tabellen

Tabelle 1: Charakteristika der bei Spirochaeten nachgewiesenen bzw. vorhergesagten Hämolysine .....	7
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Referenz- und Feldstämme .....	23
Tabelle 3: Übersicht über die gentechnisch veränderten <i>E. coli</i> -Stämme .....	24
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Plasmide .....	24
Tabelle 5: Parameter für die Induktion transformierter <i>E. coli</i> -Zellen.....	27
Tabelle 6: Größe der PCR-Amplifikate von verschiedenen Hämolysingenen von <i>B. hyodysenteria</i> .....	31
Tabelle 7: Charakteristika der Primer zum Nachweis des Vektors sowie der Hämolysingene von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	32
Tabelle 8: Eigenschaften verschiedener Sequenzierungsprimer .....	33
Tabelle 9: Erwartete Größe der rekombinant hergestellten Hämolysine von <i>B. hyodysenteria</i> .....	36
Tabelle 10: Für die Serologie verwendete Konjugate und ihre Gebrauchsverdünnung ....	39
Tabelle 11: Für die Serologie und biologischen Assays verwendete polyklonale Antiseren von Kaninchen .....	41
Tabelle 12: Für die Serologie und biologischen Assays verwendete polyklonale Antiseren von Schweinen .....	42
Tabelle 13: Für die Impfung der Kaninchen eingesetzte Antigenpräparationen .....	45
Tabelle 14: Nukleotid- und Aminosäuremutationen der Hämolysingene nach Klonierung in <i>E. coli</i> .....	49

Tabelle 15:	Variationen in den Versuchsbedingungen zur Expression der Proteine r1870-His, rHly-His und rYpIQ-His.....	58
Tabelle 16:	Proteingehalte der Chargen an rekombinanten Hämolsinen.....	58
Tabelle 17:	Verlauf der Antikörperbildung im Kaninchen gegen das Impfantigen nach Immunisierung mit rHämolsinen von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	59
Tabelle 18:	Serologisch nachweisbare Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen rHämolsinen von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	60
Tabelle 19:	Nachweis der Hämolsin-kodierenden Gene als auch der Hämolsine in verschiedenen Serotypen von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	62
Tabelle 20:	Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene rHämolsine in Serumproben von Ferkeln zu verschiedenen Zeiten vor und nach experimenteller Infektion mit <i>B. hyodysenteriae</i> .....	66
Tabelle 21:	Anzucht der Transformanten auf bluthaltigen Nährmedien mit verschiedenen Zusätzen zum Nachweis des Wachstums und der Hämolyse .....	71
Tabelle 22:	CAMP-Phänome der Transformanten im Kombinationsverfahren nach aerober Inkubation bei 37 °C.....	72
Tabelle 23:	CAMP-Phänomene der Transformanten im Standardverfahren nach aerober Inkubation bei 37 °C.....	73
Tabelle 24:	Hämolytische Aktivität der rHämolsine sowie verschiedener Extrakte der Transformanten mit Hämolsingenen (Hämolyse-Assay).....	74
Tabelle 25:	Hämolytische Aktivität verschiedener Extrakte der HlyA-Transformanten im Hämolyse-Assay .....	75
Tabelle 26:	Zytotoxizität der rHämolsine für verschiedene permanente Säugetierzellkulturen .....	76



## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, ohne die diese Doktorarbeit nicht in dieser Form entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Meinen Betreuern Dr. Werner Herbst und Dr. Stefanie Barth möchte ich danken für die gute Betreuung, die konstruktiven Diskussionen und das stetige Anhalten zur selbstständigen Arbeit sowie die schnelle Korrektur der Dissertationsschrift.

Der Graduiertenförderung der Justus-Liebig-Universität und der Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich auch meiner Arbeitsgruppe danken: Jörg Heuser – für die vielen Aufmunterungen und guten Ideen- und Regina Weil und Adelheid Heß – danke für eure Hilfe bei den PCRs und den Proteinen.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Doktoranden des Instituts bedanken. Ihr wart stets hilfsbereit, unterstützend und gut gelaunt, wir hatten eine tolle Zeit zusammen! Ein herzlicher Dank geht auch an alle übrigen Mitarbeiter/Innen des Instituts – besonders Ingrid und Kathrin für die große Hilfe bei allen Sonderwünschen.

Und schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Mann, die mich auch während der Doktorarbeit stets unterstützt und an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre ich nicht dort, wo ich heute bin! Danke



Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5984-2



9 783835 195984 2